

INAUGURAL – DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlichen - Mathematischen Gesamtfakultät
der Ruprecht – Karls – Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biologe Torsten Sacher
aus Heidelberg
Tag der mündlichen Prüfung :

**Die Rolle von Entzündungsreaktionen
bei Immunreaktionen gegen gesundes und
malignes Gewebe :
Etablierung eines autochthonen Tumormodels**

Gutachter : Prof. Dr. Günter J. Hämmerling
Prof. Dr. Hans-Ulrich Schairer

Danksagung

Zuerst möchte ich meiner Mutter für die finanzielle Unterstützung während der gesamten Promotionszeit danken. Die Aufbesserung der kärglichen Doktorandenvergütung erlaubte mir deutlich mehr Freiraum in finanziellen Angelegenheiten.

Bernd Arnold und Günter J. Hämmerling haben mir die Möglichkeit gegeben die vorliegende Doktorarbeit unter ihrer Betreuung zu erstellen und haben durch offene Diskussionen entscheidend zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Sabine Schmitt danke ich für die unermüdliche Herstellung aller in dieser Arbeit beschriebenen transgenen Mauslinien.

Günter Küblbeck und Esmail Rezavandy führten zahllose Southern Blot Analysen durch und waren immer eine große Unterstützung bei molekularbiologischen Fragestellungen aller Art.

Carmen Henrich, Sanela Paljevic und Gorana Hollmann haben mich tatkräftig in Bereichen der Zellkultur, PCR- und RT-PCR-Analysen sowie bei histologischen Methoden unterstützt.

Für die reibungslose Pflege Tausender Mäuse möchte ich Sonja Banko, Angelika Frenznick, Claudia Lay und Silke Nord danken.

In Kooperation mit Andreas Limmer (ZMBH, Heidelberg) wurden mehrere Versuche im Rahmen der Autoimmunität in einem sehr freundschaftlichen Verhältnis durchgeführt. Sein experimenteller Einfallsreichtum und immerwährende Bereitschaft zu Diskussionen waren eine große Hilfe.

Ruth Ganß stellte mir während der gesamten Promotionszeit zahlreiche Reagenzien und jede Menge Know-how zur Verfügung.

Prof. Gröne (DKFZ, Abteilung D0100) half mir bei der Bewertung histologischer Präparate, die größtenteils in seiner Abteilung erstellt wurden.

Den restliche Mitglieder des Labors danke ich für ein sehr angenehmes freundschaftliches Arbeitsklima.

Zeitraum für die Erstellung der Dissertation :

1.11.1997 – 30.10.2000

Inhaltsverzeichnis

I. EINLEITUNG	1
A. ÜBERSICHT ÜBER DAS IMMUNSYSTEM	1
1. <i>Das angeborene Immunsystem und Entzündungsreaktionen</i>	1
2. <i>Entzündung</i>	1
3. <i>Das adaptive Immunsystem</i>	3
4. <i>Entstehung, Aktivierung und Effektorfunktionen von T-Zellen</i>	5
5. <i>„Homing“ von T-Zellen</i>	6
6. <i>Aktivierung, Differenzierung und Effektorfunktion von CD4 T-Zellen</i>	7
7. <i>Aktivierung und Effektorfunktion von CD8 T-Zellen</i>	9
8. <i>Abschalten der Immunantwort und Gedächtnisbildung</i>	10
9. <i>Periphere Toleranz</i>	11
B. SCHÄDLICHER VERLUST DER TOLERANZ GEGEN SELBST – AUTOIMMUNITÄT	13
1. <i>genetische Faktoren</i>	13
2. <i>Epigenetische Faktoren</i>	14
3. <i>Infektionen und Autoimmunität</i>	14
4. <i>Autoimmunerkrankungen der Leber</i>	16
5. <i>Induktion von Autoaggression gegen Lebergewebe in unserem Tiermodell</i>	18
6. <i>Bakterielle DNA und CpG-ODN</i>	18
C. AUTOIMMUNITÄT UND ANTITUMORIMMUNITÄT	20
1. <i>Übersicht über Tumorimmunität</i>	21
2. <i>Effektormechanismen gegen Tumoren</i>	21
3. <i>T-Zell Tumorantigene</i>	23
4. <i>Induktion von Autoimmunität durch Immuntherapie gegen nicht-mutierte Selbst-Antigene</i>	26
5. <i>Die Rolle der Aktivierung tumorspezifischer T-Zellen</i>	26
6. <i>Tumorsysteme in der Maus</i>	27
7. <i>Maligne Erkrankungen der Leber</i>	28
8. <i>Autochthoner Lebertumor-Modelle</i>	29
9. <i>Onkogen-transgene Tiere</i>	31
10. <i>cre/loxP System</i>	34
II. FRAGESTELLUNG	38
III. MATERIAL UND METHODEN	40
A. MATERIAL	40
1. <i>Bezugsquellen</i>	40
2. <i>Verwendete Kits</i>	40
3. <i>Geräte</i>	41
4. <i>Puffer und Lösungen</i>	42
5. <i>Medien</i>	43
6. <i>Bakterienstämme</i>	45

7. Mauslinien.....	45
8. Antikörper.....	46
9. PCR-Primer.....	46
10. CpG -haltige Oligodeoxynukleotide (ODN)	48
11. Lipide.....	48
B. METHODEN	49
1. Molekularbiologische Arbeitstechniken	49
2. Zellbiologische Arbeitstechniken.....	60
3. Methoden zur Arbeit mit Mäusen	60
4. Gemischte Lymphozytenkultur.....	63
5. Zytotoxizitätstest	63
6. Herstellung anionischer Liposomen.....	64
7. Nachweis von ALT-Aktivität im Mausplasma	65
8. Histologische Methoden	66
9. Durchflußzytometrie	67
IV. ERGEBNISSE	69
A. ENTZÜNDUNG UND AUTOIMMUNITÄT	69
1. Induktion von Autoaggression gegen Lebergewebe in unserem Tiermodell	69
Transfer aktivierter T-Zellen in ODN-behandelte CRP-K ^b	70
3. Neutralisation von CpG-ODN induziertem IL-12 in vivo führt zu 75% verringertem Leberschaden.....	74
4. Der autoimmune Leberschaden ist transient, kann jedoch durch weitere ODN-Injektionen reinduziert oder prolongiert werden.....	75
5. kontinuierliche Entzündung führt zu transienten autoimmunen Leberschaden in CRP-K ^b x DesTZR-Tieren.....	78
6. CpG-ODN induziert eine Entzündungsreaktion in der Leber.....	81
7. ODN induziert Anreicherung von CD8 ⁺ Des ⁺ Zellen selektiv in der Leber	84
8. Anhaltende Injektion von ODN führt nicht zu chronischer selbsterhaltender Autoaggression ...	86
9. Zurückgehender Leberschaden ist mit reduzierter CD8-Zellzahl im Lebergewebe assoziiert	88
10. Hepatozyten aus ODN-behandelten CRP-K ^b Tieren zeigen Marker von professionellen APZ .	89
11. Zusammenfassung des ersten Teils :	92
B. ENTWICKLUNG EINES MAUSMODELS ZUR INDUKTION VON AUTOCHTHONEN LEBERTUMOREN.	93
1. Herstellung konditional Onkogen-transgener Mäuse	96
2. Zwei Möglichkeiten cre-Rekombinase zeitlich definiert in das System einzubringen	110
3. Zusammenfassung des zweiten Teils :	114
V. DISKUSSION.....	115
A. TEIL I : DIE ROLLE VON ENTZÜNDUNGSREAKTIONEN BEI DER INDUKTION VON AUTOIMMUNITÄT GEGEN LEBERGEWEBE	115
1. CpG-ODN ermöglicht aktivierten T-Zellen Lebergewebe antigenspezifisch zu schädigen : unabhängig von molekularer Mimikry.	116

2. <i>In vivo</i> Effekt von CpG-ODN auf die Effektorphase von T-Zellen	117
3. IL-12 als entscheidender Faktor der CpG-ODN-Wirkung	121
4. CpG-ODN und Aktivierung K ^b -spezifischer T-Zellen.	123
5. Die Autoimmunität ist vom transgenen TZR-Repertoire abhängig	126
6. Die induzierte Autoimmunität ist transient.	127
7. Vergleich zu Molekularer Mimikry und „Bystander“ Aktivierung	130
B. TEIL II : ETABLIERUNG EINES INDUZIERBAREN AUTOCHTHONEN LEBERTUMORMODELLS	132
1. Bewertung der geflochten Mäuse ATI und AST	134
2. Zwei Alternativen cre in das System einzubringen.....	138
VI. ZUSAMMENFASSUNG.....	141
VII. LITERATURVERZEICHNIS	143
VIII. ABKÜRZUNGEN.....	167

I. Einleitung

A. Übersicht über das Immunsystem

Die Hauptaufgabe des Immunsystems ist der Schutz des Organismus vor Infektionen. Das Immunsystem von Vertebraten besteht zu diesem Zweck aus zwei Teilen: das angeborene und das adaptive Immunsystem.

1. Das angeborene Immunsystem und Entzündungsreaktionen

Unter dem angeborene Immunsystem, dem entwicklungsgeschichtlich älteren Teil, versteht man Zellen und Moleküle, die an einer sehr schnellen Abwehrreaktion gegen wenige weit verbreitete Strukturen von Mikroorganismen beteiligt sind. Eine zweite Reaktion gegen das gleiche Pathogen verläuft mit der gleichen Kinetik, wie die erste Reaktion, d.h. es findet beim Erstkontakt keine sogenannte Gedächtnisbildung statt.

Im Folgenden werden die zellulären und molekularen Komponenten des angeborenen Immunsystems im Rahmen einer Immunreaktion gegen Bakterien angesprochen und die Bedeutung einer Entzündungsreaktion für deren Ablauf erläutert.

2. Entzündung

Das erste Zeichen, daß ein Erreger in den Körper gelangt ist, ist das Auftreten einer Entzündungsreaktion (Inflammation) am Ort der Infektion (Fearon *et al.*, 1996). Der Begriff Entzündung wurde ursprünglich von Cornelius Celsus rein symptomatisch definiert. Entzündete Körperstellen zeichnen sich durch Erwärmung (calor), Rötung (rubor), Schwellung (tumor) und Schmerz (dolor) aus. Diese Symptome können mittlerweile auf definierte zelluläre und molekulare Prozesse zurückgeführt werden. Beim Eintritt von Mikroorganismen in den Körper, z.B. wenn Bakterien in eine Hautwunde gelangen, werden diese zuerst von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten gebunden. Hierfür besitzen Makrophagen sogenannte „Pattern Recognition Receptors“ (PRR), die weit verbreitete bakterielle Strukturen erkennen (Janeway, 1992), wie z.B. Lipopolysaccharide (LPS; Wright *et al.*, 1990 und 1995), Mannose- und Fukose-reiche Glykoproteine und Glykolipide (Stahl, 1992), N-formylmethionylierte Peptide sowie Lipoteichonsäuren u.a. (Medzhitov und Janeway, 1997). Die Bindung dieser Liganden an PRR hat zwei Konsequenzen. Erstens phagozytieren Makrophagen und Neutrophile die Pathogene und töten sie intrazellulär mittels Proteasen (Elastase, Kollagenase, Lysozym), bakterizide Peptide (Defensin) und Radikalen

(Superoxid, Wasserstoffperoxid, Stickoxid) (Bogdan *et al.*, 2000) ab. Zweitens sezernieren Makrophagen Botenstoff (Zytokine) wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-8, IL-12 und IL-15. TNF- α führt zu einer Vergrößerung der Durchmesser lokaler Gefäße (Vasodilatation) und damit zu einem verstärkten lokalen Blutfluß, der Erwärmung und Rötung zur Folge hat. Außerdem erhöht TNF- α die Permeabilität der Gefäßendothelien (Endothelperforation) was zu einer lokalen Flüssigkeitsansammlung führt, die sich durch Schwellung und Schmerz bemerkbar macht (Robbins *et al.*, 1979). Dieser Plasmaeinstrom ist mit der Akkumulation von Komplementproteinen (Carroll, 1998) und Akutphaseproteine (C-reaktives Protein, Mannose bindendes Lektin; Sastry, 1993; Gewurz, 1995) am Infektionsort verbunden, die an Oberflächenstrukturen der Bakterien binden, was die Phagozytose der Bakterien effizienter macht (Opsonisieren). Bei der Aktivierung der Komplementkaskade werden außerdem niedermolekulare Proteine (Anaphylatoxine wie C5a) freigesetzt, die zusammen mit TNF- α und IL-1 lokale Gefäßendothelien zur Expression von Adhäsionsmolekülen stimulieren (Issekutz, 1990; Shimizu *et al.*, 1992) und damit den Austritt von Neutrophilen Granulozyten und Monozyten aus der Blutbahn ins Gewebe (Extravasation) ermöglichen bzw. beschleunigen.

Die Extravasation von Neutrophilen verläuft in 3 Schritten (Springer, 1994; D'Amico und Malavasi, 1995). Zuerst werden Leukozyten, die durch den Blutstrom rasch fortbewegt werden, abgebremst (rollende Adhäsion). Dies wird durch eine relativ schwache Bindung von Kohlenhydratstrukturen (wie Sialyl-Lewis^x, ein sialysiertes Laktosaminoglykan) auf Mucin-ähnlichen Molekülen auf Leukozyten an Selektine (zuerst P- dann E-Selektin) auf vaskulären Endothelzellen ermöglicht. Eine feste Bindung wird durch die Wechselwirkung von Immunglobulinähnlichen Molekülen auf Endothelien (ICAM-1, VCAM-1) mit Leukozyten-Integrinen (LFA-1, Mac-1) (Staunton *et al.*, 1990) induziert. LFA-1 und Mac-1 müssen jedoch erst durch eine Konformationsänderung aktiviert werden, die durch das Chemokin IL-8, das von Makrophagen sezerniert wird und an Heparansulfat von Glycosaminoglykanen der vaskulären Epithelzellen gebunden ist, induziert wird (Baggiolini, 1998). Der dritte Schritt ist die Wanderung der Leukozyten durch das Endothel (Diapedese), an der LFA-1 und Mac-1 auf Leukozyten und PCAM (CD31) auf Leukozyten und Endothelzellen beteiligt sind. Sowohl die Induktion von Adhäsionsmolekülen auf Endothelien (durch LPS) als auch die Wirkung von Chemokinen (z.B. N-formylmethionylierte Peptide) kann direkt von mikrobiellen Molekülen übernommen werden.

Für den Ablauf einer Reaktion des angeborenen Immunsystems spielen neben Neutrophilen und Makrophagen auch Natürliche Killer(NK)-Zellen eine entscheidende Rolle

(Biron *et al.*, 1999). Sie werden durch IL-12 und IL-15 von Makrophagen aktiviert und sezernieren daraufhin große Mengen Interferon- γ (IFN- γ), den potentesten Makrophagenstimulator. Die Bezeichnung Natürliche Killerzellen stammt von ihrer Fähigkeit virusinfizierte Zellen sehr schnell nach Infektion direkt zu lysieren.

Die schnelle Ansammlung von Phagozyten am Infektionsort und positive Rückkopplungsmechanismen über NK-Zellen, führt bei den meisten Infektionen zu vollständiger Eliminierung des Erregers. Bei bestimmten Pathogenen jedoch ist die Aktivierung des angeborenen Immunsystems nicht ausreichend und es kommt zur Stimulation einer adaptiven Immunantwort.

3. Das adaptive Immunsystem

Nur ein kleiner Teil der Fremd-Antigene entkommt dem angeborenen Immunsystem und kann eine adaptive Immunantwort hervorrufen. Die Bezeichnung adaptiv beschreibt die Fähigkeit dieses Systems sich im Laufe der Zeit an die Mikroorganismen anzupassen, mit denen es in Kontakt gekommen ist. Es ist in der Lage sehr spezifisch auf einzelne Erreger zu reagieren und eine Art Gedächtnis zu bilden, das erlaubt bei folgenden Kontakten eine Immunreaktion schneller und effizienter einzuleiten. Die adaptive Antwort bedarf jedoch einer Anlaufphase von mehreren Tagen, die von der angeborenen Immunantwort überbrückt werden muß. Das adaptive Immunsystem ist außerdem für seine Aktivierung, Differenzierung und Ausübung der Effektorfunktionen vom angeborenen Immunsystem abhängig. Alle drei Phasen sind sehr stark von verschiedenen Zelltypen der angeborenen Immunantwort und dem von ihnen geschaffenen Zytokin- und Chemokinmilieu beeinflusst.

Das adaptive Immunsystem besteht aus B- und T-Lymphozyten, die nach ihrem Reifungsort (primäre lymphatische Organe) benannt sind. B-Zellen entwickeln sich im Knochenmark, das der *Bursa Fabricii* bei Vögeln äquivalent ist. T-Zell-Vorläufer werden ebenfalls im Knochenmark gebildet, reifen jedoch im *Thymus* heran. Die hohe Spezifität der adaptiven Immunantwort beruht auf der stochastischen Generierung der Rezeptoren von B- (B-Zell-Rezeptor, BZR, Immunglobulin) und T-Zellen (T-Zell-Rezeptor, TZR). Hierbei werden auf genetischer Ebene DNA-Fragmente nach dem Zufallsprinzip miteinander verknüpft (somatische Rekombination) und damit nahezu unbegrenzt viele verschiedene Rezeptor-Spezifitäten gebildet. Während die Generierung der Rezeptoren von B- und T-Zellen noch recht ähnlich ist, ist die Struktur der erkannten Antigene sehr verschieden. Der BZR besitzt zwei identische Antigenbindungsstellen, die direkt an die Oberfläche von löslichen oder oberflächenständigen Molekülen mit sehr hoher Affinität ($10^{-7} - 10^{-11}$ M)

binden können. Der TZR hingegen ist monovalent und erkennt nur kleine Bruchstücke von Proteinen ausschließlich im Kontext mit körpereigenen Molekülen, die im sogenannten Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC von engl. „Major-Histocompatibility-Complex“,) kodiert sind. Der MHC des Menschen wird als HLA (für humanes Leukozyten-Antigen) und der der Maus als H-2 bezeichnet. MHC-Moleküle sind heterodimere Glykoproteine, die über eine Furche Peptide von antigenen Proteinen binden können. Um eine möglichst große Zahl verschiedener Peptide binden und präsentieren zu können besitzt jedes Individuum mehrere hochpolymorphe MHC-Gene, die sich vorwiegend in den Aminosäureresten im Bereich der Peptidbindefurche unterscheiden.

Es gibt zwei Arten von MHC-Molekülen, die sich in ihrer Struktur und der Herkunft der Peptide unterscheiden (Neefjes und Momburg, 1993; Hämmerling *et al.*, 1999). MHC Klasse I Moleküle bestehen aus einer größeren polymorphen (α -Kette) und einer kleineren monomorphen (β_2 -Mikroglobulin) Untereinheit. MHC Klasse I Moleküle sind mit Peptiden beladen, die aus dem Zytosol der Zelle stammen (Jardetzki *et al.*, 1991). Sie entstehen bei der Degradation von endogenen Proteinen, die die Zelle selbst translatiert hat und entweder vom Genom der Zelle oder eines eingedrungenen Virus kodiert sind. Der Abbau der Proteine erfolgt durch Proteasomen im Zytosol. Die generierten Peptide werden durch TAP (Transporter associated with antigen-processing) ins Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) transportiert und binden unter Mitwirkung von Tapasin in die Bindefurche des MHC-Klasse I Moleküls. Der MHC-Peptid-Komplex gelangt über den Golgi-Apparat auf die Zelloberfläche und dient sogenannten $CD8^+$ T-Zellen, die mit ihrem CD8-Korezeptor MHC Klasse I Moleküle binden können, als antigene Erkennungsstruktur. Fast alle Körperzellen exprimieren MHC Klasse I Moleküle.

Im Unterschied dazu ist die Expression von MHC Klasse II Moleküle auf professionelle antigenpräsentierende Zellen (APZ) beschränkt. Dazu gehören vor allem Zellen der angeborenen Immunantwort (Dendritische Zellen und aktivierte Makrophagen) als auch aktivierte B-Zellen. MHC Klasse II Moleküle sind aus zwei verschiedenen Untereinheiten vergleichbaren Molekulargewichts (α - und β -Kette) zusammengesetzt. MHC Klasse II Moleküle werden mit Peptiden aus phagozytierten extrazellulären und membranständigen Proteinen beladen. Die extrazellulären Antigene werden durch rezeptorvermittelte Phagozytose (bei B-Zellen durch den BZR, bei Phagozyten durch Fc- oder andere spezifische Rezeptoren) aufgenommen und in Endosomen durch saure Proteasen (Kathepsin B, D und E) zu Peptiden unterschiedlicher Länge abgebaut. In den Endosomen binden Peptide an MHC Klasse II Moleküle und die beladenen MHC Klasse II Moleküle werden anschließend an die

Zelloberfläche transportiert und sogenannten CD4⁺ T-Zellen präsentiert. CD4 ist ähnlich CD8 ein Korezeptor zum TZR, der entsprechend die Bindung an MHC Klasse II Moleküle vermittelt.

Der H-2 Locus der Maus besitzt meist 2 Genloci für MHC Klasse II (I-A, I-E) und 3 für MHC Klasse I (H-2K, H-2D, H-2L). Die entsprechenden Allele für jeden Locus werden durch hochgestellte kleine Buchstaben angegeben (z.B. H-2K^b). Die Expression von MHC Molekülen kann durch proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und IFN- γ erhöht werden, was erneut die Relevanz des Zytokinmilieus einer Entzündungsreaktion für das adaptive Immunsystems deutlich macht. Der MHC enthält noch zusätzliche immunrelevante Gene, die als MHC III zusammengefaßt werden. Dazu gehören Gene, die für den Peptidtransporter der ER-Membran (TAP), für zwei Proteasomenuntereinheiten (LMP2 und LMP7) sowie Komplementproteine (C2, C4, Bf) und Zytokine (TNF- α , TNF- β) u.a. kodieren.

4. Entstehung, Aktivierung und Effektorfunktionen von T-Zellen

Unreife T-Zell-Vorläufer werden im Knochenmark aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen gebildet und entwickeln sich über lymphatische Stammzellen zu T-Zell-Vorläufern, die das Knochenmark über die Blutbahn verlassen und in die subkapsuläre Zone des Thymus einwandern. Nach einer Proliferationsphase beginnen die Thymozyten mit der somatischen Rekombination ihrer TZR-Genfragmente. Bei erfolgreicher Rekombination der α - und der β -Kette wird der TZR auf der Oberfläche des Thymozyten exprimiert und die Zelle gelangt in den Thymuskortex. Jetzt sorgen 2 Selektionsprozesse für die Ausbildung des Repertoires immunkompetenter T-Zellen. Unreife Thymozyten, deren TZR an körpereigene MHC-Peptid-Komplexe auf dem Epithel des Thymuskortex binden können, werden positiv selektioniert (Kisielow *et al.*, 1988). T-Zellen, die körpereigenen MHC nicht erkennen können sind ohne Nutzen für das Immunsystem und sterben ab. Die **positive Selektion** führt dazu, daß reife T-Zellen nur Peptide erkennen, die von individueneigenen MHC-Allelen präsentiert werden (MHC-Restriktion; Zinkernagel *et al.*, 1979). Gleichzeitig oder erst nach der Wanderung der Thymozyten an die Grenze zwischen Kortex und Medulla werden diejenigen unreifen T-Zellen deletiert, die MHC zusammen mit gebundenem (körpereigenem) Peptid erkennen (Kappler *et al.*, 1987). Diese **negative Selektion** wird als klonale Deletion bezeichnet und beruht auf der Induktion des programmierten Zelltods (Apoptose; Murphy *et al.*, 1990). Sie eliminiert T-Zellen, deren TZR körpereigene Strukturen mit hoher Avidität binden können (Sprent *et al.*, 1988), und somit das Risiko in sich bergen Autoimmunreaktionen auszulösen. Der Thymus ist das Hauptorgan für die Toleranzinduktion gegen Selbst (**zentrale**

Toleranzinduktion). Diese klonale Deletion ist sehr sensitiv. Die Rezeptoravidität, die für die klonale Deletion im Thymus verantwortlich ist, ist niedriger als die der Aktivierung in der Peripherie (Pircher *et al.*, 1991; Knobloch *et al.*, 1992). Neben der Deletion können T-Zellen auch funktionell inaktiviert werden (van Ewijk *et al.*, 1988; Speiser *et al.*, 1990; Schönrich *et al.*, 1992a).

Im Thymus findet auch die Differenzierung der T-Zellen in 2 Subpopulationen statt, die nach der Expression von Korezeptoren CD4 und CD8 benannt sind. CD4-Zellen werden auf MHC Klasse II Moleküle, CD8 auf MHC Klasse I Moleküle selektioniert. Unreife Thymozyten exprimieren nach der somatischen Rekombination zuerst CD4 und CD8, verlieren dann jedoch eine der beiden Korezeptoren, so daß sie als einzelpositive CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen die Reifungsphase beendet haben.

5. „Homing“ von T-Zellen

Sobald Thymozyten selektioniert und zu CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen herangereift sind verlassen sie den Thymus als naive T-Zellen und zirkulieren im Blutgefäß- und Lymphsystem um den Organismus nach Antigenen abzusuchen. Eine T-Zell-Antwort kann jedoch nicht auf jeder beliebigen Körperzelle induziert werden, sondern bedarf der Antigenexpression durch professionelle APZ (vorwiegend Dendritische Zellen), die hauptsächlich in sekundären lymphatischen Organen (Milz, Lymphknoten, Peyersche Plaques) lokalisiert sind und Bestandteile des angeborenen Immunsystems darstellen. Naive T-Zellen müssen deswegen das Blutgefäßsystem verlassen und in sekundäre lymphatische Organe einwandern, um die Oberfläche von DZ auf Antigen abtasten zu können. Die Extravasation erfolgt ähnlich der von Neutrophilen, verwendet jedoch teilweise andere Chemokine (Campbell und Butcher; 2000) und Adhäsionsmoleküle (Butcher und Picker, 1996). So bindet L-Selektin der naiven T-Zellen an sulfatierte Glucosaminoglykane (Imai *et al.*, 1991; Berg *et al.*, 1991). Glykoproteine, die diese Zuckerstrukturen tragen (GlyCAM-1, CD34, MadCAM) kommen nur auf sogenannten HEVs („High Endothelial Venules“) in Lymphknoten vor und erlauben somit *ortsspezifische* Extravasation. Sie werden deswegen auch als Addressine und ihre Bindungspartner auf T-Zellen als „homing“ Rezeptoren bezeichnet. „Homing“ Rezeptoren spielen auch eine entscheidende Rolle in der Migration von *Effektorzellen* an die Orte, an denen sie ihre Funktionen ausüben.

6. Aktivierung, Differenzierung und Effektorfunktion von CD4 T-Zellen

Sobald naive CD4⁺ T-Zellen in den Lymphknoten eingewandert sind, tasten sie die Oberfläche von Dendritischen Zellen (DZ) auf die Anwesenheit ihrer Epitope ab. DZ erwerben die Epitope, indem sie durch Gewebe patrouillieren und Antigene durch Phagozytose aufnehmen, prozessieren und einzelne Peptide auf MHC Klasse II-Molekülen präsentieren, sobald sie in Lymphknoten über afferente Lymphe migriert sind (Banchereau *et al.*, 2000). Die Bindung von TZR und CD4-Korezeptor an den MHC-Klasse II-Peptid-Komplex (1. Signal) ist jedoch nicht ausreichend, um eine naive T-Zelle zu stimulieren. Sie benötigt zusätzlich ein 2. Signal (Bretscher und Cohn, 1970; Lafferty und Cunningham, 1975), das von B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) (Linsley *et al.*, 1991) auf der APZ gegeben werden kann und das als Kostimulation bezeichnet wird (Liu *et al.*, 1992; Chambers *et al.*, 1997). Die Bindung von B7.1 oder B7.2 an CD28 auf T-Zellen löst Proliferation der T-Zelle aus (June *et al.*, 1994). Neben B7.1 und B7.2 haben auch LFA-3, ICOS-R und CD40 auf APZ kostimulatorische Wirkung. Ihre Bindungspartner auf CD4 T-Zellen sind CD2, ICOS und CD40L. Für die Expression von Kostimulatoren müssen DZ jedoch aktiviert werden (Freeman *et al.*, 1989). Das geschieht direkt durch mikrobielle Produkte (z.B. LPS) oder durch proinflammatorische Moleküle (TNF- α , IFN- γ) als Mediatoren für eine Infektion (Janeway, 1992; Medzhitov, 1996). Dies erklärt, daß bei Vakzinierungen die entsprechenden Antigene mit Adjuvantien appliziert werden müssen, denn sie enthalten mikrobielle Bestandteile, die auf APZ kostimulatorische Moleküle induzieren. Zum Beispiel besteht Komplettes Freund's Adjuvanz (CFA) aus hitzeabgetöteten Mykobakterien in einer Wasser-in-Mineralöl Suspension. Das 2. Signal durch Adjuvanz-vermittelte APZ-Aktivierung besteht neben der Hochregulation von Kostimulatoren auch in der Sekretion von Zytokinen (z.B. IL-12) sowie in der erhöhten Oberflächenexpression von MHC Klasse I und II Molekülen und Adhäsionsmolekülen, die nur gemeinsam vollständige Aktivierung von T-Zellen ermöglichen (June *et al.*, 1994).

Nachdem naive CD4 T-Zellen beide Signale erhalten haben löst das eine Signaltransduktionskaskade aus, die vor allem in der Expression des IL-2 Gens resultiert, dem wichtigsten T-Zell Wachstumsfaktor (Kane *et al.*, 2000). IL-2 bindet an den schwach exprimierten IL-2R und erhöht auf autokrine Weise die Expression des Rezeptors.

Nach der klonalen Expansion differenzieren aktivierte CD4 T-Zellen in Effektorzellen, deren Aufgabe es ist die Aktivität von CD8-Zellen, Makrophagen und B-Zellen durch die Sekretion spezifischer Zytokine zu regulieren. Auch die T-Zell-Differenzierung wird durch das Zytokinmilieu des angeborenen Immunsystems entscheidend beeinflusst. IL-12 von

aktivierten Makrophagen und DZ führt zur Entwicklung von naiven CD4-Zellen (Th0) zu sogenannten Th1-Zellen, die IFN- γ , IL-2 und TNF- α sezernieren und dadurch eine zelluläre Immunreaktion gegen intrazelluläre und phagozytierte Bakterien und Viren in Gang setzen (Seder *et al.*, 1994). IFN- γ aktiviert bakterizide Aktivität von Makrophagen und führt bei B-Zellen zu einem Wechsel zum IgG2a Isotyp, der Pathogene für die Phagozytose opsonisiert und Komplement aktiviert. Eine CD4 Zelle stimuliert nur diejenigen Makrophagen oder B-Zellen, wenn sie ihr Antigen auf MHC Klasse II dieser Zellen erkennen (Lanzavecchia, 1985). So ist die Antigenspezifität der T-Helfer-Antwort gewährleistet.

Fehlt IL-12 im Mikromilieu führt vermutlich die geringe aber akkumulierende IL-4 Sekretion von Th0 Zellen zur Induktion von Th2 Zellen, die durch die Freisetzung von IL-4, IL-5 und IL-13 charakterisiert sind. Über IL-4 werden B-Zellen zum Wechsel des Isotyps von IgM zu IgG1 und IgE angeregt. IgE bindet an Eosinophile und Mastzellen und vermittelt Schutz gegenüber parasitischen Infektionen. Außerdem ist IgE ein zentrales Molekül in der Entstehung von Allergien. Somit führen Th2 Zellen vorwiegend zu einer humoralen Immunantwort gegen extrazelluläre Pathogene und deren Moleküle.

Th1 und Th2 unterscheiden sich nicht nur in den sezernierten Zytokinen, sondern auch in ihrem unterschiedlichen Migrationsverhalten. Th1-Zellen zeigen höhere Expression von Liganden für E- und P-Selektin sowie CXCR3, den Chemokinrezeptor für IP10 (IFN- γ inducible protein) und Mig (monokine induced by IFN- γ), die ihnen ermöglichen in Entzündungsherde einzuwandern und dort Makrophagen sowie CD8-Zellen zu stimulieren. Th2 Zellen hingegen exprimieren präferentiell CCR (Chemokin-Rezeptor) 3 und CCR4. CCR3 ist der Rezeptor für Eotaxin, RANTES (regulated on activation normal T cell expressed and secreted) und MCP-(monocyte chemoattractant protein)-2, -3 und -4, die bei allergischen Entzündungen freigesetzt werden.

Jede Subpopulation verstärkt die eigene Entwicklung und inhibiert die Entstehung der entgegengesetzten Subpopulation. So sezernieren Th1 Zellen IFN- γ , das ihre eigene Differenzierung antreibt, Th2 Zellen jedoch in ihrer Entwicklung unterdrückt. Umgekehrt fördern Th2 Zellen über IL-4 weitere Th2-Differenzierung, inhibieren aber über IL-10 Th1 Entstehung. Dies führt bei fortschreitenden Immunreaktionen zu verstärkter Polarisierung, deren Umpolung mit der Zeit immer schwieriger wird.

Die Differenzierung von T-Zellen beinhaltet die Veränderung der Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen, und führt damit zu modifiziertem Wanderungsverhalten. L-Selektin, das Lektin, das die Migration über HEV in Lymphknoten ermöglicht, wird herunterreguliert und LFA-1 (Lymphozyten assoziiertes Antigen) und VLA-

4 (*very late antigen*) erscheinen verstärkt auf der Oberfläche. Die Liganden für LFA-1 (ICAM-1 und ICAM-2) und VLA-4 (VCAM) sind auf entzündeten Endothelien verstärkt exprimiert und ermöglichenso das „Homing“ aktivierter T-Zellen an den Ort der Entzündung.

7. Aktivierung und Effektorfunktion von CD8 T-Zellen

Die Aktivierung von CD8 Zellen ist wie die der CD4 Zellen von der Antigenpräsentation durch professionelle APZ in sekundären lymphatischen Organen abhängig. Da nicht jedes intrazelluläre Pathogen APZ infiziert stellt sich die Frage wie Antigene dieser Erreger auf MHC Klasse I von APZ gelangen. Der Mechanismus beruht vermutlich auf der Aufnahme infizierter (oft apoptotischer) Zellen durch professionelle APZ und dem Transport mikrobieller Antigene aus dem Phagolysosom ins Zytosol, um hier wie zelleigene zytosolische Proteine degradiert und im ER auf MHC Klasse I Moleküle beladen zu werden, um sie CD8-Zellen zu präsentieren (Albert *et al.*, 1998). Dieser Vorgang wird als Kreuz-Präsentation bezeichnet (Kurts *et al.*, 1996; Heath und Carbone, 1999). Professionelle APZ erwerben auf diesem Weg wahrscheinlich auch Tumorantigene für die Stimulation von tumorspezifischen CD8 T-Zellen.

Ein zweiter wichtiger Punkt bei der Aktivierung von CD8 T-Zellen ist die häufig beobachtete Abhängigkeit von Th1-Zellen (Keene und Forman, 1982; Cardin *et al.*, 1996). Es gibt 2 Hypothesen. Einerseits sezernieren Th1 Zellen große Mengen IL-2, ein Zytokin, das die Expansion und Differenzierung von CD8 Zellen stimulieren kann (Husmann und Bevan, 1988). Andererseits binden CD4 Zellen über CD40L an CD40 von pAPZ und erhöhen deren Aktivitätsstatus, so daß diese über gesteigerte Zytokinsekretion CD8 Zellen stimulieren können (Ridge *et al.*, 1998; Bennett *et al.*, 1998; Schoenberger *et al.*, 1998).

Auf die Aktivierung folgt eine Phase ausgeprägter Proliferation. Während einer viralen Infektion in der Maus kann eine Zunahme der CD8 Zellzahl um das 500-fache nachgewiesen werden. Virusspezifische CD8 Zellen können dann bis zu 70% aller aktivierten CD8 Milzzellen ausmachen (Murali-Krishna, 1998; Gallimore *et al.* 1998). Nach der Proliferation differenzieren CD8-Zellen vorwiegend zu zytotoxischen T-Lymphozyten (ZTL), die an den Ort der Infektion wandern und dort an antigentragende Zielzellen binden. Der Zell-Zell-Kontakt wird durch Adhäsionsmoleküle (LFA-1 mit ICAM-1) verstärkt. Es folgt die Sekretion von Perforin (Lowin *et al.*, 1994), Granzym, IFN- γ , Lymphotoxin (LT) und TNF- α . Perforin polymerisiert in Anwesenheit der hohen extrazellulären Kalzium-Konzentration und lagert sich unter Ausbildung von wassergefüllten Poren in die Membran der Zielzelle ein. Dies führt einerseits zu osmotischem Anschwellen und andererseits zum Eindringen von

Granzym B ins Zytosol, wo es Kaspasen spaltet um so Apoptose zu induzieren. Ein zweiter Mechanismus der Apoptose-Induktion ist die Bindung von oberflächenständigem FasL an Fas der Zielzelle, was ebenfalls in der Aktivierung der Kaspasenkaskade und Apoptose resultiert (Lowin *et al.*, 1994). Neben infizierten Zellen dienen auch Zellen allogener Transplantate und Tumorzellen als Zielzellen für ZTL. Außerdem gibt es Berichte, die eine direkte MHC-unabhängige antimikrobielle Aktivität von T-Zellen beschrieben (Levitz *et al.*, 1995). Aktivierte CD8 Zellen können auch ähnlich wie CD4 Zellen Zytokine sezernieren und werden ähnlich wie Helfer T-Zellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Zytokinmuster in Tc1 und Tc2 unterteilt (Croft *et al.*, 1994). Ihre unterschiedlichen Funktionen im Immunsystem sind jedoch nicht so gut charakterisiert wie bei CD4 Zellen.

8. Abschalten der Immunantwort und Gedächtnisbildung

Da das Immunsystem bei der Eliminierung eines Pathogens auch körpereigenes Gewebe schädigt, muß der Verlauf der Immunantwort streng reguliert und schnellstmöglich wieder abgeschaltet werden, um unnötige Schädigung zu vermeiden. Dies wird zum einen durch die lokale Freisetzung antiinflammatorischer Zytokine, wie TGF- β , IL-4 und IL-10 sowie Prostaglandinen und Kortikosteroiden (z.B. Kortison) erreicht. Ebenso können anfänglich proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IFN- γ und IL-12 in einer späten Phase der Immunreaktion antiinflammatorisch wirken und die Effektorfunktionen von aktivierten T-Zellen inhibieren (Falcone und Sarvetnick, 1999).

Ebenso muß ein Großteil der aktivierten Lymphozyten eliminiert werden, um die zelluläre Homöostase aufrecht zu erhalten (Osborne, 1996). Überschüssige T-Zellen werden vorwiegend durch Apoptose eliminiert. Hierzu nutzen T-Zellen denselben Mechanismus wie für das Töten der Zielzelle. Nach Aktivierung wird neben CD95-Ligand auch CD95 auf der Oberfläche hochreguliert, so daß die aktivierte T-Zelle bei sich (Suizid) oder bei benachbarten T-Zellen (Fratrizid) Apoptose induzieren kann. Der Prozess wird als Aktivierungs-induzierter Zelltod (AICD) bezeichnet (Van Parijs, 1998). Ist dieser Regulationsmechanismus nicht funktionsfähig, z.B. bei Mutationen in den Genen, die für CD95 (*lpr*-Mutation; Takahashi *et al.*, 1994) oder CD95-Ligand (*gld*-Mutation; Watanabe-Fukunaga *et al.*, 1992) kodieren, kommt es zu Hyperproliferation von Lymphozyten und autoimmunen Schädigungen (Adachi *et al.*, 1993, 1995).

Nach einer Immunantwort werden jedoch nicht alle Lymphozyten aus dem Körper eliminiert. Ein kleiner Teil der spezifischen T- und B-Zellen überleben und können bei einem Zweitkontakt mit dem gleichen Erreger, schneller und effizienter reagieren als bei der

Ersreaktion. Dieses Phänomen wird als immunologisches Gedächtnis bezeichnet. Es ist ein entscheidender Vorteil des adaptiven Immunsystems (Dutton *et al.*, 1998). Es herrscht noch Unklarheit darüber, ob Gedächtniszellen kontinuierlichen Antigenkontakt oder anhaltende Proliferationstätigkeit benötigen, um reaktiv zu bleiben (Sprent, 1997).

9. Periphere Toleranz

Verläßt eine reife naive T-Zelle den Thymus kann sie wie eben beschrieben in sekundären lymphatischen Organen aktiviert werden. Derzeit geht man davon aus, daß für die Aktivierung einer naiven T-Zelle 2 Signale notwendig sind. Das 1. Signal stellt das Antigen dar. Das 2. Signal soll durch kostimulatorische Moleküle vermittelt werden. Erhält die T-Zelle nur Signal 1 ohne Signal 2, daß heißt sieht sie ihr Antigen in Abwesenheit einer Infektion (Selbstantigen), soll sie nicht aktiviert, sondern tolerisiert werden (Boussiotis *et al.*, 1994; Lenschow *et al.*, 1996). Dieser Schutzmechanismus ist notwendig, da nicht alle Selbstantigene im Thymus präsentiert werden und gegen diese Antigene somit keine zentrale Toleranz induziert werden kann. Naive T-Zellen begegnen somit manchen Selbst-Antigenen zum ersten Mal in der Peripherie. Die Toleranzinduktion im Thymus ist auf Antigene beschränkt, die in kortikalen oder medullären Thymusepithelzellen exprimiert werden und auf Antigene, die über die Blutzirkulation in den Thymus gelangen und von knochenmarksabstammenden Zellen aufgenommen, prozessiert und präsentiert werden. Gewebespezifische Antigene, die nicht in die Zirkulation freigesetzt, oder erst später in der Entwicklung exprimiert werden (Neoantigene) können keine zentrale Toleranz induzieren. Obwohl für einige gewebespezifische Proteine thymische Expression in transgenen (humanes CRP unter murinem CRP-Promotor; Klein *et al.*, 1998) und nichttransgenen Mausmodellen (Insulin, SAP, CRP, PLP u.a.; Smith *et al.*, 1997; Hanahan, 1998; Klein *et al.*, 2000) gezeigt wurde, hat man in zahlreichen Modellsystemen in der Maus periphere Toleranzinduktion nachgewiesen.

Deletion selbstspezifischer T-Zellen ist der sicherste Mechanismus der peripheren Toleranzinduktion. So führt die Injektion großer Mengen des bakteriellen Superantigens SEB (*Staphylococcus aureus* Enterotoxin B), zur Eliminierung von CD4⁺Vβ8.1,2⁺ T-Zellen, an die SEB spezifisch bindet (Kawabe und Ochi, 1991). Periphere Deletion kann ebenso beobachtet werden nach Injektion von Superantigen-exprimierenden CD8⁺ Zellen (Webb *et al.*, 1990; Huang und Crispe, 1993), H-Y-Antigen-positiven Milzzellen aus männlichen Mäusen in Weibchen (Carlow *et al.*, 1992) und Peptidantigene in der Abwesenheit von Adjuvant (Kearney *et al.*, 1994; Kyburz *et al.*, 1993). Auch die endogene Expression eines Antigens,

wie z.B. H-2K^b in der Leber, kann zu Deletion spezifischer T-Zellen führen (Bertolino *et al.*, 1995). In einigen dieser Systeme konnte gezeigt werden, daß Deletion durch die Induktion von CD95 vermittelter Apoptose erfolgt (Kawabe und Ochi, 1991; Bertolino *et al.*, 1995).

T-Zellen können durch peripheren Antigenkontakt auch *anerg* gemacht werden. Unter Anergie versteht man die Unfähigkeit einer T-Zelle auf einen Antigenstimulus in irgend einer Form zu reagieren. So gelang die Anergieinduktion *in vitro* bei humanen CD4⁺ Klonen mit Peptidantigenen (Lamb *et al.*, 1983; Jenkins *et al.*, 1987) und anschließend *in vivo* durch Injektion von Superantigenen (Kawabe und Ochi, 1991) oder von Cytochrom-c-Peptiden (Falb *et al.*, 1996).

Im Unterschied zu Anergie ist die *Herunterregulierung von TZR und/oder Korezeptor* ein reversibler Prozeß der Tolerisierung. Dies konnte in Mäusen gezeigt werden, die das MHC Klasse I Molekül K^b auf Zellen des Neuroektoderms und den K^b-spezifischen TZR exprimieren. Die Zahl CD8⁺ Des.TZR⁺ Zellen war in Lymphknoten und Milz doppeltransgener Tiere stark reduziert. *In vitro* Stimulation brachte den TZR auf den Zellen wieder zum Vorschein (Schönrich *et al.*, 1991). Auch die alleinige Herunterregulierung des Korezeptors CD8 ist beschrieben (Zhang *et al.*, 1995).

Eine autoreaktive T-Zelle kann nicht nur durch Deletion, TZR-Herunterregulierung oder Anergie, sondern auch durch regulatorische T-Zellen in Schach gehalten werden. Immunregulatorische T-Zellen sind meist CD4⁺ Zellen, die über antiinflammatorische Zytokine wie IL-4, IL-10 oder IL-13 (Saoudi *et al.*, 1995) autoreaktive Zellen inhibieren bzw. ihre Differenzierung zu Th2 bzw. Tc2 Zellen und somit die Entwicklung einer humoralen statt einer zellulären Immunreaktion fördern (Mosmann *et al.*, 1989a+b; Singer *et al.*, 1993; Seder *et al.*, 1994). Dieser Prozeß wird als Immundeviation bezeichnet.

Voraussetzung für die antigen-spezifische Tolerisierung ist der Kontakt peripherer T-Zellen mit dem Antigen. Dieser Erstkontakt in Abwesenheit eines kostimulatorischen Signals kann während einer neonatalen Phase auf parenchymalen Zellen der einzelnen Gewebe stattfinden, da naive CD8⁺ T-Zellen in diesem Zeitfenster in Gewebe infiltrieren können (Alferink *et al.*, 1998). Das Selbst-Antigen kann jedoch auch von Dendritischen Zellen in den Lymphknoten präsentiert werden, um Toleranz in CD8⁺ T-Zellen zu induzieren (Kurts *et al.*, 1997).

Aber nicht jedes periphere Antigen führt zu einer Tolerisierung autoreaktiver T-Zellen. So können T-Zellen ihr Antigen auch *ignorieren*, daß heißt sie sind morphologisch und funktionell nicht von naiven T-Zellen zu unterscheiden und können bei Aktivierung eine Autoimmunreaktion einleiten (Ohashi *et al.*, 1991; Oldstone *et al.*, 1991).

B. Schädlicher Verlust der Toleranz gegen Selbst – Autoimmunität

Ignorante T-Zellen und Zellen, die durch zentrale und periphere Toleranzinduktion nicht physisch eliminiert wurden, sind in den meisten Individuen zu finden und bilden ein Reservoir selbstspezifischer Lymphozyten, die für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen verantwortlich sind. 5-7% aller Menschen leiden an einer Autoimmunerkrankung. Wichtige Beispiele für Autoimmunerkrankungen sind insulinabhängiger Diabetes mellitus (IDDM), Multiple Sklerose (MS) und Hashimoto's Thyreoditis (HT), die durch T-Zellen und Systemischer Lupus Erythematosus (SLE) sowie Myasthenia Gravis (MG), die durch B-Zellen vermittelt werden. Seit der Entdeckung, daß das Immunsystem neben seiner protektiven auch eine schädliche Rolle im Organismus spielen kann, wird versucht diese Erkrankungen zu behandeln. Bisher überwiegen bei weitem antigen-unspezifische Behandlungsmethoden, wie z.B. anti-inflammatorische Agentien (Corticosteroide wie Dexamethason und Prednison), Substanzen, die Zellproliferation über die Inhibierung der DNA-Replikation (Methotrexat, Azathioprin, Cyclophosphamid) oder der Signaltransduktion in T-Zellen (Cyclosporin A, FK506, Rapamycin) blockieren. Diese haben den Nachteil, daß sie nicht nur die Immunreaktion gegen Selbst sondern auch gegen Fremd, sprich Pathogene, inhibieren, was zu einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen verschiedenster Art führt. Außerdem treten eine Reihe von Nebenwirkungen, wie z.B. Knochenmarkschädigung, Übelkeit, Durchfall, Hautausschlag und Niereninsuffizienz auf. Um antigenspezifische Therapien oder präventive Maßnahmen entwickeln zu können, ist es notwendig ein besseres Verständnis für die Entstehung von Autoimmunreaktionen zu gewinnen. Hierfür wurden in den letzten Jahrzehnten zahlreiche Untersuchungen durchgeführt die folgende Kriterien für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen identifizierten. Die Faktoren lassen sich grob in genetische und epigenetische unterscheiden.

1. genetische Faktoren

Aus zahlreichen Untersuchungen an Patienten und Tiermodellen geht hervor, daß genetische Faktoren eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen spielen können (Vyse und Todd, 1996). So liegt die Konkordanzrate bei eineiigen Zwillingen an IDDM zu erkranken bei 35-50%. Und bestimmte Maus-Inzuchstämme entwickeln spontan Autoimmunerkrankungen, wie z.B. SLE bei (NZBxNZW)F1-Tieren und IDDM bei weiblichen NOD-Mäuse. Der genetische Locus, der die stärkste Assoziation mit dem Auftreten von Autoimmunerkrankungen hat, ist der

Haupthistokompatibilitäts-Komplex (MHC für „Major Histocompatibility Complex“). So haben Menschen mit dem HLA-B27-Allel (MHC Klasse I) ein 90- bis 100-fach erhöhtes Risiko an ankylosierender Spondylitis, einer entzündlichen Gelenkerkrankung, zu erkranken als Individuen mit anderen HLA-B-Allelen. Die meisten der *häufigen* Autoimmunerkrankungen zeigen jedoch eine Assoziation mit MHC-Klasse II statt mit MHC Klasse I. So erhöht das DR-4-Allel (MHC-Klasse II) das Risiko an Rheumatoider Arthritis zu erkranken um das zehnfache und DR3/4-Heterozygotie das IDDM-Risiko um das 20-fache. Neben dem MHC-Lokus sind noch andere Gene mit Autoimmunerkrankungen assoziiert. Bei NOD-Mäusen konnten 20 Loci auf 13 verschiedenen Chromosomen identifiziert werden. Diese Loci enthalten Gene für verschiedene Zytokine (IL-1, IL-2, IL-4), sowie Rezeptoren von Lymphozyten (TCR α und TCR β , Ig κ , CTLA-4) und gewebespezifische Antigene (z.B. Insulin).

Genetische Faktoren sind jedoch nicht ausreichend um die Entstehung von Autoimmunerkrankungen zu erklären, denn wie schon erwähnt beträgt die Konkordanzrate bei eineiigen Zwillingen „nur“ 35-50%. Die restlichen 50-65% werden durch epigenetische Faktoren bestimmt.

2. Epigenetische Faktoren

Unter den epigenetischen Faktoren sticht heraus, daß dreimal so viele Frauen an Autoimmunerkrankungen erkranken als Männer. In den USA sind 6,7 Mio. Frauen und nur 2,3 Mio. Männer betroffen. Bei einzelnen Autoimmunerkrankungen ist das Verhältnis noch auffälliger. So erkranken 9 Frauen pro Mann an SLE. Dieser frappierende Unterschied legt nahe, daß Sexualhormonen eine entscheidende Rolle im Erkrankungsprozeß zukommt. Tatsächlich führt eine Verringerung der Testosteronkonzentration durch Kastration männlicher NOD-Mäuse, die sonst nicht erkranken, zu einer höheren Inzidenz von IDDM. Ebenso kann die Injektion von Östrogen im Mausmodell zu SLE führen.

Neben dem Geschlecht spielen auch die geographische Region und der Lebensstil (Bach, 1994; Berdanier, 1995) eine Rolle bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen.

3. Infektionen und Autoimmunität

Die Beobachtung, daß manchen Autoimmunerkrankungen bestimmte bakterielle oder virale Infektionen vorausgehen, hat die Vermutung aufgebracht, daß sie ursächlich zusammenhängen (Whitton und Fujinami, 1999). So hatten manche Patienten, die an Rheumatoider Arthritis leiden, eine Infektion mit Streptokokken der Gruppe A durchlaufen.

IDDM ist assoziiert mit Coxsackie B Virus und Rubella-Virus Infektionen (Gamble, 1980). Ebenso kann eine Infektion mit *Borrelia burgdorferi* durch einen Zeckenstich chronische Arthritis auslösen (Aberer *et al.*, 1989). Allerdings nur bei Betroffenen, die HLA-Allele DR2 oder DR4 tragen, was erneut zeigt, daß für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen meist mehrere Voraussetzungen zusammenkommen müssen. Infektionen bestimmter Erreger korrelieren auch mit Multipler Sklerose (Kurtzke, 1993; Panitch, 1994), Ankylosierender Spondylitis (Gilliland und Mannik, 1986) und anderen Autoimmunerkrankungen. Ein weiterer Hinweis für die Relevanz von Infektionen bei Autoimmunerkrankungen ist die Möglichkeit in bestimmten Mausstämmen Autoimmunerkrankungen auszulösen, indem ihnen ein Homogenat des betreffenden Gewebes zusammen mit bakterienhaltigen Adjuvantien verabreicht wird. Auf diese Weise kann z.B. EAE (Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis), das Mausmodell für Multiple Sklerose, induziert werden.

Der Mechanismus, wie Infektionen Autoimmunerkrankungen induzieren können, ist immer noch eine offene Frage. Verschiedene Szenarien werden diskutiert. Eine Möglichkeit ist die Expression von *Superantigenen* durch das Pathogen, die eine Subpopulation von T-Zellen unabhängig von ihrer Spezifität aktivieren und dabei auch autoreaktive Zellen stimulieren, die anschließend eigenes Gewebe angreifen (Conrad *et al.*, 1994). Dieser Mechanismus ist sowohl für bakterielle (Brocke *et al.*, 1993) als auch für virale Superantigene (Scherer *et al.*, 1993) beschrieben.

Der zweite Mechanismus beruht auf einer direkten Aktivierung autoreaktiver T-Zellen durch bakterielle oder virale Epitope. Ursache ist eine strukturelle Ähnlichkeit von Selbst- und Fremd-Epitop, die als *molekulare Mimikry* bezeichnet wird (Oldstone, 1998; Fujinami *et al.*, 1985). So kreuzreagieren T-Zellen einer IDDM-Risikogruppe, die gegen ein Glutamat-Decarboxylase-(GAD)-Epitop gerichtet sind auch mit einer Determinante des P2C Proteins von Coxsackie B Virus. (Atkinson *et al.*, 1994; Tian *et al.*, 1994). Auch konnten MBP-spezifische T-Zell-Klone aus MS-Patienten durch fünf verschiedene Epitope von unterschiedlichen Mikroorganismen (Herpes Simplex Virus, Epstein Barr Virus, Adenovirus, Influenza Typ A Virus, *Pseudomonas aeruginosa*) zu Proliferation angeregt werden (Wucherpfennig und Strominger, 1995).

Ein weiterer Mechanismus wird als sogenannte „*bystander*“ Aktivierung bezeichnet, bei der in Abwesenheit von struktureller Mimikry selbstreaktive T-Zellen während einer Immunantwort gegen ein Pathogen stimuliert werden (Whitton und Fujinami, 1999). Um dieses Phänomen erklären zu können werden verschiedene Szenarien diskutiert. So könnte durch einen anfänglichen Gewebeschaden, der entweder durch einen direkten zytolytischen

Effekt des Erregers oder durch die antimikrobielle Immunantwort verursacht wird, große Mengen Selbst-Antigen freigesetzt werden, die durch professionelle APZ aufgenommen werden und zur Stimulation autoreaktiver T-Zellen führen (Horwitz *et al.*, 1998). Das würde bedeuten, daß die Immunantwort zuerst gegen pathogene Antigene gerichtet ist, dann aber auf körpereigene Antigene übergeht, ein Vorgang der als „Epitop-Spreading“ bezeichnet wird (Lehmann *et al.*, 1992; Miller *et al.*, 1997). „Bystander Aktivierung“ könnte durch die hohe lokale Konzentration von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, die während einer Immunreaktion gebildet werden, angetrieben werden (Tough *et al.*, 1996). Dazu gehören TNF- α , IFN- γ , IFN- α/β , IL-1, IL-6, IL-12 u.a., die vorwiegend von Th1-Zellen und Makrophagen vor Ort sezerniert werden. So führt auch die konstitutive transgene Expression von proinflammatorischen Zytokinen in einigen Mausmodellen zu Autoimmunität (Sarvetnick *et al.*, 1990; Horwitz *et al.*, 1997; Green *et al.*, 1998). Hier zeigt sich erneut die zentrale Rolle von Entzündungsreaktionen bei der Regulation der Aktivität von T-Lymphozyten.

Bei allen angesprochenen Mechanismen muß bedacht werden, daß sowohl im Patienten als auch im Tiermodell das infizierte Organ häufig auch das Ziel der Autoimmunreaktion ist und die Unterscheidung zwischen einem autoimmunen Gewebeschaden und einer Immunreaktion gegen ein persistierendes Pathogen schwierig ist (Rose, 2000) und vorwiegend von der Empfindlichkeit der Nachweismethoden für die Existenz einer mikrobiellen Infektion abhängt. So scheint z.B. die Immunantwort gegen das Rabies-Virus und nicht eine Autoimmunreaktion Nervenzellen zu schädigen.

4. Autoimmunerkrankungen der Leber

Ein relativ großer Prozentsatz der Weltbevölkerung entwickelt entzündliche Lebererkrankungen (Hepatitis, Blumberg, 1997). In den meisten Fällen verlaufen die Krankheiten mild und, wie im Fall von Hepatitis B Infektionen, schnell und vom Patienten unbemerkt. Einige Patienten entwickeln jedoch chronische Leberschäden, die mit Leberzirrhose und Hepatozellulärem Karzinom tödlich enden können (Chisari, 1996; Krawitt, 1996). Autoimmunreaktionen gegen Lebergewebe können entweder Hepatozyten (autoimmune Hepatitis, AH) oder Gallengangsepithelzellen (primäre biliäre Zirrhose, PBC; primäre sklerotisierende Cholangitis, PSC) betreffen. Von viralen Hepatitiden werden sie in erster Linie durch die Abwesenheit viraler Proteine (z.B. Oberflächenantigen des Hepatitis B Virus, HBsAg) im Serum der Patienten und der Sensitivität gegenüber der Behandlung mit dem Immunsuppressivum Prednisolon unterschieden (Rose und Mackay, 1985).

Symptome von AH sind chronische Appetitlosigkeit, Gelbsucht, Fieber, Muskel- und Gelenkschmerzen, Splenomegalie und Schmerzen im oberen Bauchraum. Die Mortalität unbehandelter AH ist mit 80% innerhalb von 5 Jahren sehr hoch. In Europa erkranken 5 bis 8 Menschen pro 100.000 Einwohner an AH (Bjarnason *et al.*, 1982). Frauen erkranken viermal häufiger als Männer (Meyer-zum-Büschendorf *et al.*, 1992).

AH ist durch erhöhte Serumwerte an γ -Globulin und Transaminasen (Alanin-, Aspartat-Aminotransferase), einer ausgeprägten lymphozytären Infiltration in Leberparenchym und der Existenz von Autoantikörpern gekennzeichnet (Rose und Mackay, 1985). Das sind im Wesentlichen Antikörper, die als Folge einer Th2-vermittelten Immunantwort, gegen ubiquitäre intrazelluläre Antigene wie Aktin, Proteine des Zellkerns, der Mitochondrien und Proteine der glatten Muskulatur entstehen. Eines der wenigen bekannten zellulären Antigene der Autoantikörper in AH ist der Asialoglykoprotein-Rezeptor, ein leberspezifisches Membranmolekül. Sie dienen als zuverlässige diagnostische Marker für AH. Ihre Funktion in der Pathogenese ist jedoch unklar (Meyer-zum-Büschendorf *et al.*, 1990).

Für eine Beteiligung von T-Zellen an der Pathogenese sprechen mehrere Faktoren. *Erstens* ist AH wie viele andere Autoimmunerkrankungen mit bestimmten MHC-Allelen (HLA-A1, -B8, -DR3) assoziiert (Rose und Mackay, 1985). *Zweitens* enthält das lymphozytäre Infiltrat neben Plasmazellen vorwiegend CD8- und CD4- $\alpha\beta$ T-Zellen (Eggink *et al.*, 1982; Bach *et al.*, 1992). Aus Patienten isolierte CD4-Zell-Klone sind spezifisch für LKM-1(liver-kidney-microsomal1)-Antigen, daß die immundominante Region des Zytochroms P450IID6 Antigens enthält. *Drittens* gehören die Autoantikörper dem IgG-Isotyp an, dessen Bildung von Th2-Zellen abhängt. Außerdem gibt eine Reihe von Tiermodellen Hinweise für eine dominierende Rolle von CD8⁺ T-Zellen in der Pathologie von Leberschäden. Ein Großteil der Daten wurde mit transgenen Mäusen erhalten, die das Oberflächenantigen des Hepatitis B-Virus (HBsAg) in der Leber exprimieren (Chisari, 1996). Ergebnisse aus verschiedenen Modellen für autoimmunen Leberschaden zeigen, daß Leberschäden, die durch LCMV-Virus-Infektionen, Propionibakterien/LPS oder Concanavallin-A induziert worden sind, letztendlich auf T-Zellen und die von ihnen sezernierten Moleküle TNF- α , IFN- γ und CD95L zurückgehen (Löbner *et al.*, 1994; Chisari und Ferrari, 1995; Kondo *et al.*, 1997; Matsui *et al.*, 1997).

Obwohl die genaue Krankheitsursache nicht bekannt ist, geht man davon aus, daß Infektionen als auslösende Faktoren eine Rolle spielen. Klinische Beobachtungen lassen den Schluß zu, daß virale Infektionen, wie durch Masern-, Hepatitis- und Epstein-Barr-Viren, als Krankheitsursachen in Frage kommen, wobei AH auch als Nebenreaktion einer IFN- γ -

Behandlung gegen virale Hepatitis beobachtet wurde (Krawitt, 1996). Eine Rolle der CD8⁺ T-Zellen wurde in AH und vor allem bei der viralen Hepatitis (B und C) nachgewiesen, jedoch sind die genauen Mechanismen im Menschen unbekannt.

5. Induktion von Autoaggression gegen Lebergewebe in unserem Tiermodell

Um der Frage nachzugehen, unter welchen Bedingungen eine Immunreaktion gegen Lebergewebe zustande kommt, wurde folgendes System gewählt.

Mäuse, die unter der Kontrolle des Albumin-Promotors das MHC-Klasse I Molekül H-2K^b auf Hepatozyten (Schönrich *et al.*, 1992) und außerdem den K^b spezifischen TZR (DesTZR) auf einem großen Teil der T-Zellen exprimieren (Schönrich *et al.*, 1991), zeigen eine funktionelle Tolerisierung der transgenen T-Zellen. Dies zeigt sich sowohl im Ausbleiben einer spontanen Autoimmunerkrankung als auch im subkutanen Wachstum des Transplantationstumors P815, der mit dem K^b-Gen transfiziert ist (P815.K^b). Obwohl K^b-spezifische T-Zellen *in vivo* aktiviert werden konnten, war weder Autoaggression gegenüber Lebergewebe noch Infiltration aktivierter K^b-spezifischer T-Zellen in Leberparenchym zu beobachten. Erst wenn nach der T-Zell-Aktivierung zusätzlich noch eine Infektion mit dem Bakterium *Listeria monocytogenes*, das nach intravenöser (i.v.) Injektion vornehmlich Milz und Leber befällt (Harty *et al.*, 1996), infiltrieren und attackieren die aktivierten T-Zellen Leberwebe. Dies läßt sich durch eine erhöhte Aktivität des leberspezifischen Enzyms Alanin-Aminotransferase (ALT) im Plasma der Tiere nachweisen läßt (Limmer *et al.*, 1998; Abb. 1). Teile dieser Studien wurden im Rahmen der Diplomarbeit durchgeführt.

In weiterführenden Studien sollte untersucht werden, ob es sich bei dem beschriebenen Leberschaden ausschließlich um eine Autoaggression handelt, oder ob der transgene DesTZR nicht mit einem von Listerien stammenden Peptid kreuzreagiert, ein Vorgang der als *molekulare Mimikry* bekannt ist. Aus diesem Grund sollte eine Entzündung in der Leber nicht durch eine Infektion mit einem komplexen Erreger, sondern durch ein Reagenz induziert werden, das die Präsentation eines körperfremden Peptids auf K^b ausschließt. Zu diesem Zweck könnten sogenannte CpG-Oligodeoxynukleotide (CpG-ODN), in das System eingeführt werden.

6. Bakterielle DNA und CpG-ODN

CpG-ODN sind einzelsträngige DNA-Sequenzen, die ein oder mehrere *unmethylierte* CpG-Dinukleotide in konservierten Hexanukleotid-Strukturen (Purin-Purin-C-G-Pyrimidin-

Pyrimidin) enthalten (Wagner, 2000; Raz, 2000). Solche Sequenzen (CpG-Inseln) sind in der DNA von Vertebraten 5-fach seltener anzutreffen als statistisch erwartet (sogenannte CpG-Suppression; Bird, 1980) und außerdem zu 70% methyliert. Die verbleibenden CpG-Inseln sind meist nicht von den entsprechenden Nukleotiden benachbart um ein stimulatorisches Hexanukleotid zu bilden. Man findet CpG-Dinukleotide jedoch in normaler Frequenz in der DNA von Bakterien, Hefen, Avertebraten (Nematoden, Mollusken, Insekten) und Pflanzen. Sie stellen somit ähnlich wie z.B. Lipopolysaccharide (LPS), Lipoproteine, Mannose, N-formylmethioninhaltige Peptide und doppelsträngige RNA mikrobielle Strukturen dar, die dem angeborenen Immunsystem als Signal für eine Infektion dienen können (Wagner 1999) und es stimulieren. CpG-ODN werden deswegen auch als immunstimulatorische Sequenzen (ISS) bezeichnet.

Der erste Beweis, daß bakterielle DNA als Immunstimulanz fungieren kann, kam 1992 als entdeckt wurde, daß eine MY-1 bezeichnete Fraktion von *Mycobacterium bovis* BCG (Bacillus Calmette Guerin) über die Aktivierung von NK-Zellen Tumorstadium inhibieren kann (Yamamoto *et al.*, 1988; Tokunaga *et al.*, 1992). MY-1 enthält 70% (einzelssträngige) DNA, 28% RNA, 1,3% Proteine und 0,2 % Kohlenhydrate. Die Aktivität der MY-1 Fraktion konnte durch DNase- aber nicht durch RNase-Verdau zerstört werden. Daraufhin wurden 13 einzelssträngige 45-mere Oligodeoxynukleotide (ODN) aus der cDNA-Sequenz von mykobakteriellen Proteinen synthetisiert und erkannt, daß nur die CpG-haltigen ODN NK-Zell-Aktivität in Milzzellkulturen induzieren konnten (Yamamoto *et al.*, 1992). cDNA-Sequenzen von humanen Proteinen waren nicht stimulatorisch. Wird das Cytosin im CpG-Dinukleotid in 5'-Position methyliert (Krieg *et al.*, 1995), oder die Sequenz zu GpC invertiert, erlischt die immunstimulatorische Aktivität. Doppelsträngige CpG sind ebenfalls immunstimulatorisch. Sie aktivieren Dendritische Zellen und Makrophagen direkt, vermutlich über einen noch unbekannten Rezeptor, zur Hochregulation von MHC- (Klasse I und II) und kostimulatorischen Molekülen (B7.1, B7-2, CD40) und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen (wie z.B. IL-12, TNF- α , IFN- $\alpha/\beta/\gamma$, IL-1, IL-6, u.a.) (Krieg *et al.*, 1995; Yamamoto *et al.*, 1992). IL-12, TNF- α und IFN α/β aktivieren NK-Zellen (Ballas *et al.*, 1996; Chace *et al.*, 1997; Halpern *et al.*, 1996), die 90% der frühen IFN- γ produzierenden Zellen ausmachen (Cowdery *et al.*, 1996). B-Zellen werden direkt von CpG-ODN zu Proliferation (Splénomegalie), polyklonaler IgM-Sekretion, Zytokinsekretion (IL6, IL-12) und Hochregulierung von Oberflächenmolekülen (MHC Klasse I und II, B7.1, B7.2, CD40, ICAM, Fc γ R, IL-2R, IFN γ R) stimuliert (Krieg *et al.*, 1995; Messina *et al.*, 1991; Sun *et al.*, 1997). Ein intrinsischer Effekt von CpG-ODN auf T-Zellen ist sehr schwach. Eine direkte

Aktivierung in Abwesenheit des Antigens (1. Signal) ist *nicht* beschrieben. Auch Kostimulation (2. Signal) mittels CpG-ODN ist beschränkt. So können *in vitro* naive T-Zellen, die ihr 1. Signal über α -CD3-Vernetzung erhalten, nur schwach kostimuliert werden (Bendigs *et al.*, 1999; Lipford *et al.*, 2000). T-Zellen unterliegen aber einem deutlichen extrinsischen Effekt. Werden Antigene mit CpG-ODN als Adjuvanz *in vivo* appliziert, wird eine starke Th1-Reaktion induziert, da CD4 T-Zellen nach der Aktivierung in der Anwesenheit großer Mengen IL-12 (von professionellen APZ) zu Effektorzellen differenzieren (Seder *et al.*, 1994). Th2 Immunantworten werden durch CpG-ODN unterdrückt. Sie inhibieren IgE-Induktion und damit allergische Reaktionen, wie Eosinophil-vermittelte Lungenentzündung in einem Maus-Model für Asthma (MacAry *et al.*, 1998; Roman *et al.*, 1997) und allergische Konjunktivitis (Magone *et al.*, 2000a).

Bei intraperitonealer Applikation kommt es unter anderem zu systemischen Entzündungsreaktionen, die von Infiltrationen von Immunzellen in verschiedene Gewebe wie Niere, Leber, Pankreas, Lungen und Lymphknoten in unterschiedlichem Ausmaß begleitet werden (Branda *et al.*, 1993; McIntyre *et al.*, 1993; Zhao *et al.*, 1996). Da 80% aller sessilen Makrophagen in der Leber resident sind (Cope *et al.*, 1990), das entspricht 15% aller Zellen in der Leber, und diese durch CpG-ODN stark stimuliert werden, ist eine präferenzielle Inflammation in diesem Organ zu erwarten.

CpG-ODN sind Nuklease-sensitiv und weisen nur eine geringe Halbwertszeit im Serum von Versuchstieren auf. Um die Stabilität zu erhöhen werden ausschließlich Phosphorothioat-ODN in Experimenten eingesetzt. Dabei ist ein Sauerstoff-Atom im Phosphatrest durch ein Schwefelatom ersetzt, was die Stabilität um das 200-fache erhöht (Campbell *et al.*, 1990; Hoke *et al.*, 1991). Die Modifikation hat keine Auswirkung auf die geringe Toxizität der ODN.

C. Autoimmunität und Antitumorimmunität

Die Anwesenheit selbstreaktiver T-Zellen birgt jedoch nicht nur das Risiko der Entstehung von Autoimmunerkrankungen – den unerwünschten Immunreaktionen gegen *gesundes* körpereigenes Gewebe, sondern weckt auch die Hoffnung protektive Immunreaktionen gegen *malignes* Selbst (benigne und maligne Tumoren) induzieren zu können.

Nach der ersten Identifizierung von Tumorantigenen konzentriert sich heute ein großer Teil tumorimmunologischer Forschung auf die Entwicklung von Immunisierungsstrategien für eine optimale Aktivierung tumorspezifischer T-Zellen. Nach unseren oben beschriebenen

Studien zur Brechung von Toleranz und Induktion von Autoaggression könnte die Aktivierung tumorspezifischer T-Zellen allein nicht ausreichen, um Tumore in einem intakten Gewebe anzugreifen. Komponenten eines Entzündungsprozesses könnten dazu notwendig sein. Diese Annahme wird durch die Beobachtung unterstützt, daß in Tumormodellen Transplantationstumore - die Injektion von vielen Tumorzellen verursacht natürlich eine Entzündungsreaktion am Injektionsort - durch eine Aktivierung des Immunsystems sehr erfolgreich eliminiert werden, während beim Menschen mit langsam wachsenden Tumoren in intakten Organen ähnliche Erfolge ausblieben. Die Entwicklung induzierbarer, autochthoner Tumor-Modelle im Tier, die der menschlichen Situation eher entsprechen, ist daher essentiell. Die zweite Aufgabe im Rahmen dieser Arbeit war deshalb der Aufbau eines derartigen Systems. Im Folgenden werden die theoretischen Grundlagen für diese Studien erläutert.

1. Übersicht über Tumorimmunität

Nach der Beherrschung von Infektionskrankheiten sind gutartige (benigne) und bösartige (maligne, Krebs) Tumoren in der westlichen Welt nach Erkrankungen des Herzkreislaufsystems die Haupttodesursache. Jährlich erkranken 340.000 Menschen in Deutschland an Krebs und mehr als 210.000 erliegen dem Leiden. Die klassischen Behandlungsmethoden sind Chemotherapie, Bestrahlung und chirurgische Entfernung der Geschwulst. In Abhängigkeit von der Tumorart sind mit diesen Therapien eher mäßige Erfolge erzielt worden. Sie weisen aber auch entscheidende Nachteile auf. So sind Chemotherapie und Bestrahlung unspezifische Anwendungen, die neben Tumoren auch normales Gewebe schädigen können. Folge von chemotherapeutischer Behandlung sind unter anderem Haarausfall, Übelkeit und Immunsuppression mit resultierender Infektionsanfälligkeit. Lokale Bestrahlung ist nur bei nicht-metastasierten Tumoren wirkungsvoll. Chirurgische Entfernung erhöht das Risiko von Metastasierung, der Verbreitung von Tumorzellen über die Blutbahn im gesamten Körper.

Mit der Erforschung des Immunsystems stieg auch die Hoffnung dieses körpereigene Abwehrsystem für die Bekämpfung von Tumoren zu nutzen. Man verspricht sich antigenspezifische statt unspezifischer Antitumorreaktivität und deswegen das Ausbleiben von Nebenwirkungen herkömmlicher Therapien.

2. Effektormechanismen gegen Tumoren

Im Laufe der letzten Jahrzehnte konnten verschiedene Immunzellen, die für Antitumorantworten verantwortlich sind, identifiziert werden.

Die ersten Tumorantigene wurden mit Hilfe von *Antikörpern* entdeckt. Dementsprechend lag es nahe Antikörper als tumorspezifisches Reagenz in Therapien einzusetzen (Scott und Welt, 1997; Glennie und Johnson, 2000). Die Effektormechanismen sind die gleichen, wie bei humoralen Immunreaktionen gegen Pathogene. Neben Opsonisierung der Tumorzellen für die Phagozytose durch Makrophagen und Aktivierung von Antikörper-abhängiger Zytotoxizität (ADCC) durch NK-Zellen wird auch Komplement aktiviert. Diese Mechanismen können außerdem aktiviert werden, durch die Verwendung bispezifischer Antikörper, die Effektorzellen mit Tumorzellen vernetzen (Van de Wink *et al.*, 1997; Little *et al.*, 2000). Neben diesen physiologischen Effektormechanismen werden vermehrt auch artifizielle Mechanismen eingesetzt. Dazu gehört die Kopplung von tumorspezifischen Antikörpern mit Toxinen wie Rizin oder Diphtherie-Toxin (Immunotoxine), mit Radioisotopen (Goldenberg *et al.*, 1995) oder antitumor-Medikamenten. Problem der meisten antikörper-vermittelten Immuntherapien ist das Auswachsen von Tumorvarianten, die das Oberflächenantigen verloren haben, da diese häufig nicht für die Aufrechterhaltung des Tumorwachstums notwendig sind. Immunotoxine induzieren Antitoxin-Antikörper und Nebenwirkungen wie z.B. Leberschädigung.

NK-Zellen können Tumorzelllinien (Leukämie) *in vitro* töten, besitzen aber nur eine sehr geringe Zytotoxizität gegen frisch isolierte Tumorzellen. Als Zielzellen kommen nur solche Tumorzellen in Betracht, die MHC Klasse I herunterreguliert oder verloren haben, da NK-Zellen durch MHC Klasse I Moleküle inhibiert werden (Biron *et al.*, 1999). Sie spielen als Lymphokin-aktivierte Killerzellen (LAK) zusammen mit CD8⁺ T-Zellen eine entscheidende Rolle bei adoptiven Immuntherapien (Lotze *et al.*, 1981; Rosenberg *et al.*, 1985). Ihre Relevanz in der Antitumorantwort in Patienten ist noch unklar.

T-Zellen wird eine dominierende Rolle in der Antitumorantwort zugesprochen. Trotzdem fehlt bis jetzt ein klarer Beweis ihrer tumorzerstörenden Wirkung im Menschen, 80% aller humanen Tumore sind von T-Zellen infiltriert, die als sogenannte Tumor-infiltrierende-Lymphozyten (TIL) bezeichnet werden (Rosenberg, 1997). Die *in vitro* Aktivierung von TIL (Rosenberg *et al.*, 1986 und 1988) mit anschließendem Transfer in Tumorpatienten konnte nur partielle Erfolge gegen humane Tumoren erzielen (Rosenberg *et al.*, 1991). Im Mausmodell hingegen gelang die Abstoßung chemisch bzw. UV-induzierte Tumoren (North *et al.*, 1984; Awwad und North; 1990; Ward *et al.*, 1988 und 1990).

3. T-Zell Tumorantigene

Grundlage für die Hoffnung T-Zellen im Kampf gegen Tumoren einzusetzen, kam durch Arbeiten von Prehn und Main Ende der 50er Jahre (Prehn und Main, 1957). Sie zeigten als erste, daß Tumoren spezifisch von CD8⁺ T-Zellen abgestoßen werden können. Sie bestrichen Haut von Mäusen mit dem chemischen Karzinogen Methylcholanthren (MCA) und entfernten anschließend die Sarkome, um sie als Zellsuspension in syngene Tiere subkutan zu transplantieren. Die Rezipienten haben den Transplantationstumor akzeptiert, während sie im Donor abgestoßen werden. Transferiert man jedoch vor Injektion der Tumorzellen CD8⁺ T-Zellen der Donormäuse in die syngenen Tiere, stoßen diese die Tumorzellen ab. Da die Antigene durch die Abstoßung von Transplantationstumoren definiert waren, wurden sie als Tumor-spezifische-Transplantations-Antigene (TSTA) bezeichnet.

Welche Antigene T-Zellen auf Tumoren erkennen, wurde erst Anfang der 90er Jahre entdeckt (Pardoll, 1994; Tsomides und Eisen, 1994; Boon *et al.*, 1995; DePlaen *et al.*, 1997; Van den Eynde und Van den Bruggen, 1997). Grundlage hierfür war die Isolierung von tumorspezifischen T-Zell-Klonen, die als sensitive Detektionsmittel dienten. Tumorspezifische T-Zell-Klone wurden generiert, indem T-Zellen aus Blut, Lymphknoten oder Tumor isoliert und mit Tumorzellen desselben Patienten kokultiviert wurden. Die meisten T-Zell-Epitope wurden entweder mit der biochemischen oder genetischen Methode identifiziert. Beim *biochemischen* Ansatz (Cox *et al.*, 1994) werden Peptide durch Säurebehandlung von MHC Klasse I Molekülen der Tumorzellen eluiert und der Peptid-Pool mittels HPLC fraktioniert. Die Peptid-Fraktionen werden auf Zielzellen geladen, die einen passenden MHC tragen. Anschließend wird getestet, ob die Zielzelle durch die Peptidbeladung sensitiv für die Lyse durch tumor-spezifische T-Zell-Klone geworden ist. Ist das der Fall, kann durch Massenspektroskopie die Aminosäuresequenz festgestellt und im Vergleich mit Proteindatenbanken auf Mutationen untersucht werden. Die *genetische* Methode (Boon *et al.*, 1989; Van den Bruggen *et al.*, 1991) beruht auf der Herstellung einer cDNA-Bibliothek von einer Tumorzelllinie und der anschließenden stabilen Transfektion einer Zelllinie, die die MHC-Allele der Tumorzelle exprimiert, mit cDNA-Pools. cDNA-Pools, die die Lyse der Transfektanten durch tumorspezifischen T-Zell-Klone ermöglichen, werden subfraktioniert und die Prozedur so lange wiederholt, bis eine einzelne cDNA identifiziert ist. Anhand deren Sequenz können dann Peptide synthetisiert und wie oben beschrieben auf Aktivierung von T-Zell-Klonen getestet werden.

Grob können 2 Klassen von Tumorantigenen unterschieden werden. Antigene von mutierten und nicht mutierten Strukturgenen.

3.1. Antigene mutierter Strukturgene

Mutierte Gene können Onkogene (Disis und Cheever, 1996), Tumorsuppressorgene oder Gene sein, deren Produkte keine Funktion in der Tumorentstehung haben. Der Vorteil von mutierten Genen besteht in der Generierung von tumorspezifischen Antigenen und damit der Möglichkeit, daß hochaffine nicht tolerisierte T-Zellen auf diese Neoantigene effektiv stimuliert werden können. Epitope von Onkogenen (ras, Bcr/Abl, p210, Her-2/neu) und Tumorsuppressorgenen (p53) sind geeignete Zielstrukturen für T-Zellen (Abrams *et al.*, 1996; Gjertsen *et al.*, 1995), da sie für die Erhaltung des transformierten Zustands notwendig sind und die Tumorzellen diese Antigene nicht „verlieren“ können um der Immunantwort zu entgehen. Das häufige Auftreten von Mutationen in Onko- und Tumorsuppressorgenen (p53-Mutationen bei 50% aller humanen Tumoren, mutiertes ras bei 10% aller Karzinome) ist Grundlage für zahlreiche Studien (Greenblatt *et al.*, 1994). Ein Problem ist jedoch, daß in Tumorpatienten Peptide von mutierten Antigenen nur selten von ZTL erkannt werden und sie deswegen für Immuntherapien nur eingeschränkt verwendbar sind (Abbas *et al.*, 2000). Außerdem liegen Mutationen oft an verschiedenen Bereichen der Moleküle, so daß jeder Patient andere Epitope aufweist (Hollstein *et al.*, 1991), was eine breitanwendbare Therapie weiterhin erschwert. Mutierte Gene, die keine Funktion in der Kanzerogenese haben, dazu gehören die meisten der schon angesprochenen TSTA, sind selten in spontan entstehenden Tumoren, sondern vorwiegend in chemisch oder Strahlungs-induzierten Tumoren in Tiermodellen zu finden. So z.B. p91A vom murinen Mastozytom P815 (DePlaen *et al.*, 1988). Auch Produkte von *onkogenen Viren* stellen ähnlich wie mutierte Gene fremde Antigene dar, gegen die keine Toleranzinduktion stattgefunden hat. Dazu gehören E6 und E7 Proteine von Papillomaviren in Cervixkarzinomen (Ressing *et al.*, 1995; Evans *et al.*, 1996), EBNA-1 von Epstein-Barr Virus (EBV) in B-Zell-Lymphomen (Thorley-Lawson *et al.*, 1982) und T-Antigen von SV40 in experimentellen Maustumoren. Virus-induzierte Tumoren zählen deswegen zu den immunogensten Tumoren überhaupt (Abbas, 2000).

3.2. Antigene nicht-mutierter Strukturgene

Der weitaus größte Teil der Tumorantigene wird von *nicht-mutierten* Strukturgenen kodiert und stellen somit Selbst-Antigene dar, die der zentralen oder peripheren Toleranzinduktion unterworfen sein können.

Differenzierungsantigene sind in Tumorzellen und ihren nichtmalignen Vorläuferzellen vorhanden. Dazu gehört das Prostata-spezifische Antigen und Antigene auf B-Zell-Lymphomen, wie CD10, CD20 und der Immunglobulin-Idiotyp. Letzterer ist ein Sonderfall

unter allen nicht-mutierten Antigenen, da der Idiotyp einer B-Zelle klonspezifisch und das daraus resultierende Tumorantigen somit einmalig ist (Abbas, 2000). Andere, gut charakterisierte Beispiele für Differenzierungsantigene sind Tyrosinase, gp100 und MART, die in Melanozyten und Melanomzellen exprimiert sind (Boon *et al.*, 1995). Da diese Antigene in Melanom-Zellen überexprimiert, in Melanozyten jedoch so schwach exprimiert sind, daß keine Toleranzinduktion stattfindet, stellen sie interessante Zielstrukturen für Therapien dar.

Die zweite Kategorie von Tumorantigenen sind *Onkofetale Antigene* (Gold und Freedman, 1965). Dabei handelt es sich um Proteine, die vermutlich aufgrund einer Retrodifferenzierung von transformierten Zellen in „fötale“ Zellen, erneut exprimiert werden. Die prominentesten Vertreter sind α -Fetoprotein (AFP) und carcinoembryonales Antigen (CEA). Bis jetzt gibt es noch keinen Beweis, daß diese Antigene Zielstrukturen für T-Zellen sein können.

Testis und Plazenta Antigene werden im Unterschied zu Onkofetalen Antigenen nicht zur falschen Zeit, sondern am falschen Ort exprimiert. Hierzu gehören die Melanoma-Antigene (MAGE), BAGE und GAGE, die eigentlich spezifisch für Plazenta und Testis sind (DePlaen *et al.*, 1994), aber auch in Melanomen, Karzinomen der Blase, Haut, Brust, Lunge und Prostata sowie einigen Sarkomen produziert werden können (Boon *et al.*, 1996). Da Plazenta und Testis zu immunprivilegierten Organen zählen, werden hier exprimierte Antigene häufig vom Immunsystem ignoriert (Haas *et al.*, 1988), was in der Anwesenheit hochaffiner T-Zellen in der Peripherie resultiert sollte, die für die Bekämpfung des Tumors dienen könnten.

Zur letzten Gruppe zählen *Glykolipide und Glykoproteine*, die aufgrund gestörter Synthese modifizierte Zuckerstrukturen tragen oder Proteinbestandteile anormal exponieren, die als Antigene dienen können. Zu den Glykolipiden gehören die Ganglioside GM₂, GD₂ und GD₃ von Melanomzellen, die allerdings in erster Linie als Antigene für Antikörper und weniger für T-Zellen dienen (Abbas, 2000). Unter den Glykoproteinen sind besonders Mucine zu nennen, deren Polypeptidkette zahlreiche O-gekoppelte Kohlenhydratseitenketten tragen. Neben CA-125 und CA-19-9 auf Ovarialkarzinom ist MUC-1 bei Brustkrebs und Melanomen ein regelmäßig modifiziertes Glykoprotein. MUC-1 ist nur in Tumorzellen unpolar statt sonst apikal auf der Zelloberfläche exprimiert. Interessanterweise sind manche T-Zellen in der Lage an das freigelegte Polypeptidrückgrat direkt ohne Beteiligung von MHC-Molekülen zu binden (Barnd *et al.*, 1989).

4. Induktion von Autoimmunität durch Immuntherapie gegen nicht-mutierte Selbst-Antigene

Die meisten Antigene, die von T-Zellen auf Tumoren erkannt werden sind somit Selbst-Antigene (Nanda *et al.*, 1995). Damit besteht das Risiko, daß nach Aktivierung dieser autoreaktiven Zellen nicht nur der Tumor, sondern auch gesundes körpereigenes Gewebe angegriffen wird (Moudgil und Sercarz, 1994; Nanda *et al.*, 1995; Houghton, 1994). Ein Beispiel für Antitumor-begleitende Autoimmunität ist die Immuntherapie gegen Melanome. Tyrosinase, ein Enzym das an der Melanin-Synthese beteiligt ist, wird von Melanozyten nur in geringen Mengen hergestellt. Melanomzellen überexprimieren Tyrosinase jedoch. Nach dem Transfer von Tyrosinase-spezifischen TIL zusammen mit IL-2 Behandlung werden einerseits Melanomzellen abgestoßen, andererseits aber auch nichtmaligne Melanozyten angegriffen, was in einer harmlosen Depigmentierung der Haut (Vitiligo) bei 16% der behandelten Patienten resultiert (Rosenberg *et al.*, 1996). Außerdem korreliert spontane Vitiligo bei Melanom-Patienten mit einer guten Prognose (Nordlund *et al.*, 1983). In einigen Mausmodellen konnte ebenfalls eine erfolgreiche Antitumoraktivität ohne schädliche Autoimmunität gegen ubiquitäre Selbst-Antigene beobachtet werden (Hu *et al.*, 1993; Vierboom *et al.*, 1997; Morgan *et al.*, 1998; Overwijk *et al.*, 1999).

5. Die Rolle der Aktivierung tumorspezifischer T-Zellen

Es ist auffällig, daß nur ein geringer Anteil der Krebspatienten deren T-Zellen gegen Selbsttumorantigene aktiviert wurden oder die einen adoptiven Transfer aktivierter T-Zellen erhalten haben, eine vollständige Abstoßung der Tumoren erkennen läßt. Die meisten der behandelten Patienten zeigen nur einen partiellen oder gar keinen Effekt der Immuntherapie (Rosenberg *et al.*, 1996). Tumore können sich durch eine Reihe von Mechanismen einer Immunantwort aktivierter T-Zellen entziehen. Zu diesen Ausweichstrategien zählen Verlust des Antigens (Jager *et al.*, 1996), Herunterregulation von MHC-Klasse I-Molekülen (Möller *et al.* 1991; Rivoltini *et al.*, 1995; Garrido *et al.*, 1997) oder anderen Komponenten der Antigenpräsentation (Momburg *et al.*, 1996a+b, 1989), Sekretion von immunsuppressiven Molekülen wie z.B. TGF- β (Torre-Amione *et al.*, 1990; Ranges *et al.*, 1987) oder IL-10 (Becker *et al.*, 1994; Matsuda *et al.*, 1994) und Toleranzinduktion in tumorreaktiven T-Zellen, z.B. durch die Expression von CD95L auf der Oberfläche der Tumorzellen (O'Connell *et al.*, 1996; Hahne *et al.*, 1996).

Neben diesen Mechanismen gibt es Hinweise auf weitere Ausweichstrategien von Tumoren. So scheint der Übertritt der T-Zellen aus der Blutbahn in das Tumorgewebe blockiert zu sein (Ganß *et al.*, 1998). Das korreliert bei einigen Tiermodellen mit der fehlenden Expression von Adhäsionsmolekülen auf Gefäßwänden der Tumoren, die aktivierten T-Zellen das „Homing“ ermöglichen könnten (Ganss *et al.*, 1999). Auch das Tumorstroma, ein Begriff, der Gefäße, sessile und migratorische Zellen sowie extrazelluläre Matrix zusammenfaßt, kann die Abstoßung eines Tumors verhindern (Singh *et al.*, 1992).

6. Tumorsysteme in der Maus

Die meisten Studien in der Tumorummunologie wurden mit Hilfe von transplantierbaren Tumorzellen (Transplantationstumoren) durchgeführt. Hierbei werden aus spontanen oder induzierten Tumoren Zellsuspensionen hergestellt, die, meist nach *in vitro* Kultivierung, in ein Empfängertier transplantiert werden. Die Vorteile dieses Tumorsystems sind neben schnellem Tumorwachstum (tötet den Wirt meist innerhalb von 4 Wochen) auch leichte Charakterisierung (Expressionsstatus) sowie Manipulation (Transfektion) der Tumorzelllinie vor Applikation, die meist subkutan aber auch intramuskulär oder intravenös erfolgen kann. Bei oberflächlich wachsende Transplantationstumoren kann das Wachstum und der Erfolg von Behandlungen *in vivo* leicht verfolgt werden. Somit können viele Parameter bei Experimenten mit Transplantationstumoren standardisiert werden.

Die meisten dieser Vorteile liegen jedoch auf der *experimentellen* Seite. Die Aussagekraft von Experimenten mit Transplantationstumoren auf die Tumorthherapie von humanen Primärtumoren ist jedoch eingeschränkt, denn sie unterscheiden sich in einer Reihe *biologischer* Parameter.

Humane Primärtumoren entstehen, nach heutigem Kenntnisstand, aus einer einzigen transformierten Zelle und wachsen dann allmählich im Verlaufe von Monaten und Jahren über mehrere Zwischenstufen zu Primärtumoren heran (Hanahan, 1988; Barrett, 1992; Weinberg, 1989). Humane Primärtumoren bilden sich somit am Ort ihrer Entstehung und werden deswegen als autochthone (von lat.-griech. „am Fundort entstanden“) Tumoren bezeichnet. Sie entwickeln sich im Umfeld von nicht transformierten Zellen des gleichen Organs bzw. Gewebes. Im Unterschied dazu entwickeln sich Transplantationstumoren ektopisch. So werden z.B. Nierenzellkarzinomzellen subkutan injiziert und wachsen dort aus.

Schon in den 50er Jahren wurde festgestellt, daß Transplantationstumoren immunogener sind als autochthone Tumoren (Old *et al.*, 1962; Johnson, 1968; Prehn und Bartlett, 1987). Wird aus einem autochthonen Methylcholanthren-induzierten Tumor eine

Tumorzellsuspension hergestellt und in dasselbe Tier transplantiert, so kommt es zur Abstoßung der injizierten Tumorzellen (Prehn und Main, 1957; Klein *et al.*, 1960). Auch die Injektion von Tumorzellen in tumortragende Mäuse kann zur Abstoßung der transferierten Tumorzellen führen, ohne den etablierten Tumor anzugreifen (concomitant immunity). Hierfür gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Autochthone Tumoren entstehen aus normalen Körperzellen durch allmähliche Akkumulation von kanzerogenen Mutationen. Die graduelle Transformation geschieht in der permanenten Anwesenheit des Immunsystems, was zu Selektion von schwächer immunogenen Varianten führen kann (Vaage, 1968; Carswell, 1970; Morton *et al.*, 1969; Bahler *et al.*, 1987). Transplantierte Tumorzellen sind schon vollständig transformiert wenn sie in den Rezipienten gelangen, und wachsen deswegen sehr schnell (Heike *et al.*, 1994). Auch die Applikation von Tumorzellen als *Suspension* erhöht die Chancen eine Immunreaktion zu stimulieren (Singh *et al.*, 1992). Einzelne Zellen können sich vom Injektionsort lösen und in den drainierenden Lymphknoten gelangen, wo sie nach Aufnahme durch Dendritische Zellen T-Zellen aktivieren können (Yang *et al.*, 1997). Autochthone Tumoren wachsen im Zellverband aus dem erst durch absterbende Tumorzellen oder metastasierende Zellen Tumorantigene in Blut oder Lymphe gelangen. Die höhere Immunogenität von Tumorzellsuspensionen gegenüber solidem Tumorgewebe konnte in einem Tumortransplantationsmodell gezeigt werden (Singh *et al.*, 1992). So wurde eine Suspension eines Spindelzelltumors abgestoßen, solide Tumorfragmente des gleichen Tumors jedoch akzeptiert. Das gleiche Ergebnis ergaben Experimente mit einem Fibrosarkom (Ochsenbein *et al.*, 1999).

Der *Applikationsort* des Transplantationstumors kann ebenfalls entscheidend sein bei der Induktion einer Immunantwort. Die Haut ist ein Organ, das beim Eindringen von Pathogenen sehr effektiv Immunreaktion einleiten kann. Tumorzellen, die subkutan appliziert werden, können ähnlich einer Infektion eine effiziente Immunantwort auslösen. Dies steht im starken Kontrast zu Tumoren, die in anderen Organen als der Haut, wie z.B. in der Niere, im Auge, im zentralen Nervensystem oder in der Leber, wachsen.

7. Maligne Erkrankungen der Leber

Mit ca. 1 Mio Neuerkrankungen pro Jahr gehören Tumoren der Leber und des Gallengangs zu den häufigsten Erkrankungen weltweit (Parker *et al.*, 1996). In den USA erkranken jährlich 15.400 neue Patienten an Lebertumoren, von denen 50% die Gallenblase, 30% die Gallengänge und 20% Hepatozyten (Hepatozelluläres Karzinom, HCC) betreffen (Simonetti *et al.*, 1991). Ähnlich wie bei den autoimmunen Erkrankungen sind viermal mehr

Frauen als Männer betroffen. In westlichen Industrieländern ist Alkohol die Hauptursache für HCC. Die hohen Inzidenzraten in afrikanischen und asiatischen Ländern sind hingegen mit Mykotoxin-kontaminierten Nahrungsmitteln (vorw. Aflatoxin B₁ von *Aspergillus flavus*) und chronischen hepatotropen Infektionen (Hepatitis B- und C-Viren) assoziiert (Lutwick, 1979). Die wichtige Rolle von HBV-Infektionen bei HCC zeigt sich ebenfalls in der Bildung von Lebertumoren bei transgener Expression des gesamten HBV-Genoms (Chisari *et al.*, 1989) oder nur des HBx-Gens (Kim *et al.*, 1991) in Mäusen.

Hepatozelluläre Karzinome werden im klinischen Alltag in erster Linie durch chirurgische Entfernung der betroffenen Leberbereiche mit nachfolgender Lebertransplantation behandelt. Es werden jedoch auch zahlreiche Studien unternommen HCC durch lokale Chemotherapie über die Leberarterie (Infusion von Doxorubizin und Cisplatin) in der Proliferation zu hemmen (Carr *et al.*, 1991). In Tiermodellen mit transgenen Lebertumoren konnte mittlerweile auch die Effektivität von adoptiver T-Zell Immuntherapie gezeigt werden (Romieu *et al.*, 1998), was die Hoffnung auf eine antigenspezifische Therapie anfaht.

8. Autochthoner Lebertumor-Modelle

Um den Einfluss der Aktivierung von T-Zellen und der Abhängigkeit ihrer Effektorfunktion von einer Entzündungsreaktion in der Leber untersuchen zu können wurde nach Möglichkeiten gesucht in der Leber einen autochthonen Tumor zu induzieren.

Spontane Leberkarzinogenese ist zwar in suzeptiblen Mausstämmen wie z.B. B6C3F1 oder C3H gehäuft anzutreffen aber trotzdem noch zu selten, als daß die vorgesehenen Experimente mit ihnen durchgeführt werden können. Männchen von B6C3F1-Hybriden bilden mit einer Wahrscheinlichkeit von 7 bis 58% Hepatozelluläres Karzinom aus (Tarone *et al.*, 1981), benötigen dafür jedoch über ein Jahr (Ward *et al.*, 1979). Es mußte somit eine Möglichkeit gefunden werden, um Lebertumoren induzieren zu können.

Die Leber von Nagern ist besonders empfindlich gegenüber einer Reihe chemischer Substanzen (Karzinogene), die die Entstehung von Tumoren (Karzinogenese) induzieren können (Übersichtartikel : Williams *et al.* 1997; Beer and Pitot 1989). Ursache dafür ist vermutlich die physiologische Funktion der Leber, Giftstoffe oder hydrophobe Verbindungen aus dem Blutkreislauf zu filtern und über das P₄₅₀-System zu oxidieren, um sie einerseits zu inaktivieren und andererseits wasserlöslich zu machen, was die Ausscheidung über die Niere ermöglichen soll. Ist die Leber jedoch nicht in der Lage die anfallende Menge an Kanzerogenen zu inaktivieren, können diese sich in das Genom einlagern (Interkalieren) oder

es kovalent modifizieren und Mutationen auslösen. Viele dieser Mutationen sind unbedeutend für die Zelle, da sie nichtkodierende Bereiche betreffen, ein rezessives Allel treffen oder zu keiner Veränderung in der Genexpression führen. Andere Mutationen sind schädlich für die Zelle und führen im äußersten Fall zum Zelltod. Entscheidend sind Mutationen, die ein Wachstums-inhibierendes Gen (Tumorsuppressorgen) inaktivieren (Hooper, 1998) oder ein Wachstums-aktivierendes Gen (Protoonkogen) aktivieren und es so in ein Onkogen verwandeln (Buzard *et al.*, 1996). Jedoch ist eine einzige Mutation nicht ausreichend, um eine Zelle zu transformieren. Es bedarf einer Akkumulation von Mutationen (Mehr-Schritt-Modell der Tumorentstehung) um unkontrollierte Proliferation einzuleiten (Williams, 1980; Farber, 1992). Bei menschlichen Zellen sind hierzu mindestens 3 Faktoren notwendig (SV40Tag, Telomerase, H-ras) (Hahn *et al.*, 1999). Diesen Prozess haben transplantierte Tumorzellen schon vollständig durchlaufen, wenn sie appliziert werden. Er bedarf bei der Induktion von autochthonen Tumoren in Abhängigkeit der verwendeten Substanz jedoch einiger Zeit (Vesselinovitch und Mihailovich, 1983). Nahezu alle Leberkarzinogene benötigen mindestens 8 Monate kontinuierlicher Applikation (injiziert, gasförmig, gelöst). So führt Saflor nach 52 Wochen in 50% und erst nach 75 Wochen in 100% der permanent befütterten Tiere zu HCC (Lipsky *et al.* 1981). Um die Kinetik zu beschleunigen sind deutlich höherer Dosen notwendig, die zu toxischen Nebenwirkungen führen können, die in unserem System vermieden werden sollen. Die Applikation von Karzinogenen ist meist systemisch und führt somit nicht nur in der Leber, sondern *auch in anderen Organen zu Tumorbildung* (Übersichtsartikel : Drew *et al.* 1983). Vinylchlorid induziert bei chronischer Applikation neben HCC auch Mammakarzinom, Adenokarzinom des Magens, Karzinom der Haut und der Lunge sowie Lymphome in der Maus (Emmerich *et al.* 1981). Ein weiterer entscheidender Nachteil von chemisch induzierten Lebertumoren ist auch, daß jeder Tumor andere Mutationen aufweist und es somit *kein tumorspezifisches Antigen* gibt gegen das antigenspezifische T-Zell Antitumorimmunität untersucht werden kann. Mutationen in definierten Genen treten zwar öfter auf (wie z.B. ras) sind jedoch im Auftreten für die geplanten Experimente nicht zuverlässig genug. Außerdem zeigen einige der potentesten Leberkarzinogene bei Mäusen auch *kanzerogene Wirkung für humanes Lebergewebe* (z.B. Vinylchlorid; IARC 1987b) und erfordern bei dauerhaften Umgang erhöhte Sicherheitsvorkehrungen. Ethanol, das HCC beim Menschen auslösen kann und in der Applikation unbedenklich wäre, ist interessanterweise aus noch nicht geklärten Gründen nicht kanzerogen für die Leber von Nagern. Aus den angeführten Gründen sind chemische Karzinogene somit nicht geeignet um ein Mausmodell für unsere Fragestellung zu etablieren.

Physikalisch (Röntgen-, UV-, radioaktive Strahlung) induzierte Tumoren sind zwar für bestimmte Organe beschrieben (vor allem Melanom) führt aber nicht zu Lebertumoren. Außerdem führt systemische Bestrahlung zur Induktion von Immunsuppression und scheidet schon aus diesem Grunde aus (Ullrich und Kripke, 1984).

Die dritte Möglichkeit Lebertumoren zu induzieren, sind biologische Methoden. Dazu gehören einerseits Biomoleküle (wie z.B. Aflatoxin) und Infektionen (Hepatitis-B-Virus, HBV beim Menschen; *Helicobacter hepaticus* bei der Maus). Aflatoxin ist wie schon Vinylchlorid auch für den Menschen schon in geringen Mengen leberkarzinogen und verbietet sich ebenfalls aus Sicherheitsgründen (IARC 1987a). HBV-Infektionen sind in Asien und Afrika die Hauptursache für humane HCC. Bei der Maus führt die Infektion mit HBV nicht zu HCC. Außerdem induziert eine virale Infektion in der Leber eine Entzündung, deren Rolle im System ja erst untersucht werden soll und somit bei der Tumorinduktion vermieden werden muß.

9. Onkogen-transgene Tiere

Eine weitere biologische Methode ist die *transgene Expression eines Onkogens in Versuchstieren*. Transgene Tiere tragen in ihrem Genom ein zusätzliches Gen (Transgen). Dazu wird lineare DNA des gewünschten Gens in den männlichen Vorkern von befruchteten Eizellen injiziert (Gordon *et al.*, 1980). Einige behandelte Eizellen integrieren die DNA an beliebiger Stelle ins Genom und geben sie durch Zellteilung an alle Körperzellen und somit auch über die Keimbahn an die Nachkommen weiter. Sie exprimieren das Transgen abhängig vom verwendeten Promotor. Durch gewebespezifische Promotoren kann die Expression des Transgens auf bestimmte Organe und Entwicklungsstadien beschränkt werden. Seit Entwicklung der Methode Anfang der achtziger Jahre (Gordon *et al.*, 1980; Brinster *et al.*, 1981; Harbers *et al.*, 1981; Wagner *et al.*, 1981) sind transgene Mausmodelle mittlerweile in zahllosen Experimenten verwendet worden und haben großen Anteil am Verständnis biologischer Prozesse im lebenden Organismus.

Transgenese wird seit 1984 (Brinster *et al.*, 1984; Stewart *et al.*, 1984) auch benutzt, um über die Expression von Onkogenen organspezifisch autochthone Tumore zu generieren. Onkogen-transgene Tiere haben einen großen Beitrag an der Erforschung von humanen Primärtumoren (Adams und Cory, 1991; Hanahan *et al.*, 1996; Hursting, 1997; Rosenberg, 1997). Es wurden eine Reihe von Onkogenen (c-myc, ras u.a.) unter verschiedenen gewebespezifischen Promotoren auf ihr kanzerogenes Potential *in vivo* überprüft. Unter ihnen ist das große Tumor-Antigen des Simian Virus 40 (SV40 großes T-Antigen, kurz Tag) das

einziges, das sowohl zu Immortalisierung als auch zu Transformation führt (Butel *et al.*, 1986a+b; Rigby *et al.*, 1983; Stahl *et al.*, 1987) und somit eine für autochthone Tumoren schnelle Karzinogenese ermöglicht. Das große T-Antigen ist zu 90% im Nukleus und zu 10% über eine Palmitoylierung an der Plasmamembran lokalisiert (Klockmann *et al.*, 1983; Butel *et al.*, 1986a). Tag-Expression kann in nahezu allen Organen (selbst in der Linse des Auges) zu Tumorbildung führen (Mahon *et al.*, 1987; Cory *et al.*, 1988; Hanahan, 1988). Tag ist ein außergewöhnlich multifunktionelles Protein, das eigene enzymatische Aktivitäten besitzt (ATPase, Helikase), Replikation und Transkription viraler und zellulärer DNA aktiviert und mit verschiedenen zellulären Proteinen (p53, Rb, Hsp70, Proteinkinasen, DNA-Polymerase α) komplexiert (Butel *et al.*, 1990). Dabei spielt die Bindung an die Tumorsuppressorgen-Produkte p53 und Rb (Produkt des Retinoblastomgens) im Kern eine entscheidende Rolle bei der Transformation (Bradley *et al.*, 1982; Rigby *et al.*, 1983; Butel *et al.*, 1986a; DeCaprio *et al.*, 1988). Trotz der Vielzahl an Interaktionen ist das große T-Antigen nicht in der Lage eine Zelle vollständig zu transformieren. Es ist auf die Akkumulation von Mutationen im Genom der Wirtszelle angewiesen. Beweis dafür ist die Tatsache, daß in Mäusen, die das große T-Antigen unter der Kontrolle des Ratten-Insulin-Promotors in den β -Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas exprimieren, zwar alle Inseln Tag herstellen, aber nur 50% hyperplastisch werden und letztendlich nur 2% ein Insulinom entwickeln (Hanahan, 1985; Teitelman *et al.*, 1988). Die Tag-Expression erhöht somit nur die Prädisposition, daß weitere Mutationen die Zelle vollständig transformieren und nimmt somit nur einige Schritte im Mehr-Schritt Modell für Karzinogenese vorweg.

Für die Generierung von transgenen Mäusen wird meist nicht nur die kodierende Sequenz des großen T-Antigens (Tag) verwendet, sondern die gesamte frühe Region des Virus, die außerdem noch für das kleine T-Antigen (tag) kodiert. Alternatives Spleißen generiert beide mRNAs aus einem RNA-Vorläufer. Die Kooperation beider T-Antigene ist für die Transformation von sich langsam teilenden Epithelzellen von Lunge und Niere notwendig (Choi *et al.*, 1988). Für Tumorbildung in Lymphozyten und Epithelzellen anderer Organe ist die Expression des großen T-Antigens ausreichend. Für die Transformation von Hepatozyten ist die aminoternale Region des großen T-Antigens ausreichend (Bennoun *et al.*, 1998).

Die Verwendung des großen T-Antigens hat einen weiteren wichtigen Vorteil. Es ist das einzige Onkogen für das sowohl eine CD4 als auch eine CD8 TZR-transgene Mauslinie hergestellt wurde. Eine Linie besitzt CD4-T-Zellen, die das Tag-Epitop 362-384 auf dem murinen Klasse II Molekül I-A^k erkennen (Förster *et al.*, 1995). Der CD8⁺ abhängige TZR der zweiten Linie ist spezifisch für den Komplex aus MHC Klasse I Molekül H-2K^k und den

Aminosäuren 559-576 von Tag (Geiger *et al.*, 1992). Hieraus erklärt sich auch die Bezeichnung als T-Antigen, da es in Mausmodellen zu T-Zell-Aktivierung führen kann (Gooding *et al.*, 1983; O'Connell und Gooding, 1984; Schirmbeck *et al.*, 1992).

Spezifische Tag-Expression in der Leber führt in verschiedenen Mausmodellen zu Lebertumor (HCC). Kinetik, Gewebespezifität und Metastasierung unterscheiden sich jedoch aufgrund der verwendeten Promotoren (Macri *et al.*, 1993). Der α 1-Antitrypsin-Promotor (Sepulveda *et al.*, 1989) führt neben HCC auch zu Hyperplasien in Pankreas, Niere und Magen. Der Promotor des α -Amylase-Gens ergab auch Tag-Expression und maligne Tumoren im braunen Fettgewebe (Fox *et al.*, 1989). Der humane Antithrombin III Promotor (Dubois *et al.*, 1991; Romieu *et al.*, 1997, 1998) ergibt makroskopisch sichtbare Lebertumoren erst nach 5 Monaten. Der *Albumin-Promotor* ermöglicht als einziger ausschließliche Tag-Expression in der Leber und schnelle Entwicklung von HCC innerhalb von 3 bis 6 Monaten nach Geburt (Sandgren *et al.*, 1989; Hino *et al.*, 1989). Die Tiere bilden erst in den späten Stadien des HCC Lungenmetastasen (nach 20 Wochen).

Ein Nachteil der konstitutiven Tag-Expression unter dem Albumin-Promotor besteht jedoch in der neonatal beginnenden Tag Expression und Transformation in Hepatozyten. Der Zeitpunkt der Onkogenese kann nicht frei bestimmt werden. Humane Tumoren entstehen jedoch vorwiegend im Erwachsenen.

Ein zweiter gravierender Nachteil konventioneller transgener Tiere liegt in der vollständigen Penetranz der Tag-Expression im Lebergewebe. Nahezu jeder Hepatozyt exprimiert Albumin und folglich auch Tag und kann transformieren. Eine Situation die im Menschen nicht angetroffen wird und die Bekämpfung des transgenen Tumors noch erfolgloser macht als die Behandlung humaner Geschwulste. Dies zeigt sich darin, daß es bisher in keinem transgenen Tiermodell gelungen ist, das Tumorwachstum vollständig und nachhaltig zu unterdrücken. Konventionelle Onkogen-transgene Systeme sind auch aus rein praktischen Gründen problematisch. So kann die schnelle Tumorentstehung die Verpaarungsfähigkeit der Tiere beeinträchtigen.

Um diese Probleme zu vermeiden soll ein *induzierbares* (konditionales) leberspezifisches transgenes System verwendet werden. Um solch ein System zu etablieren sind drei Ansätze mit Konstrukten aus induzierbaren Promotoren und Tag als Onkogen unternommen worden. Der Metallothionein-Promotor kann durch Schwermetalle induziert werden, führt jedoch neben Leber auch in Pankreas und Niere zu Tumorbildung (Dyer *et al.*, 1989). Der Promotor der L-Typ Pyruvat-Kinase (LPK) wird über Kohlenhydrate aktiviert verursacht aber zusätzliche Tumoren im endokrinen Pankreas (Cartier *et al.*, 1992). Das dritte

System verwendet den Promotor des C-reaktiven Proteins (CRP), dessen Induktion über LPS, IL-1 oder IL-6 (Ganter, 1989) jedoch zu Entzündung in der Leber führt, die wie schon erläutert vermieden werden soll (Rüther *et al.*, 1993).

Die derzeit existierenden induzierbaren leberspezifischen Systeme sind folglich nicht für die angestrebte Fragestellung geeignet. Da wie oben beschrieben der Albumin-Promotor die verlässlichste Gewebespezifität und Kinetik der Karzinogenese liefert soll dieser Promotor verwendet werden, um ein *neues induzierbares leberspezifisches transgenes System* zu etablieren. Eine Möglichkeit der Induktion von Transgenen unter Verwendung eines konstitutiven Promotors liefert das cre/loxP-System.

10. cre/loxP System

Cre (von engl. cyclization recombinase) Rekombinase ist ein 38 kDa Protein des *E. coli* Bakteriophagen P1, das Rekombination zwischen zwei 34 Basenpaare (Bp) langen Erkennungsstellen, die als *loxP* Sequenzen bezeichnet werden (von engl. locus of X-over of P1), katalysiert (Hamilton und Abremski, 1984). Jede loxP-Sequenz besteht aus zwei 13 Bp langen invertierten Sequenzen, die eine 8 Bp lange asymmetrische Kernsequenz flankieren (Abb. 1A). Abhängig von der relativen Orientierung und Lokalisation der loxP-Sequenzen resultiert die cre-vermittelte Rekombination in Inversion, Exzision/Integration oder Translokation der dazwischen liegenden DNA-Bereiche (Abb. 1B,C,D) und ermöglicht dadurch zahlreiche Eingriffe in das Genom von Zellen und ganzen Organismen. Zwar sind alle Reaktionen reversibel, aber aufgrund unterschiedlicher Reaktionskinetiken sind intramolekulare Rekombinationen (Inversion, Exzision) effizienter als intermolekulare (Integration, Translokation) (Metzger und Feil, 1999).

Das cre/loxP-System stellt somit ein geeignetes System dar, um Genom-Modifikationen in Zellen und vor allem in Versuchstieren vorzunehmen. Die grundlegende Strategie dabei ist es, loxP-flankierte („gefloxt“) DNA-Segmente ins Genom zu integrieren und anschließend cre-Rekombinase einzubringen. So kann mit Hilfe des cre/loxP-Systems die Expression eines Transgens angeschaltet werden. Dies wird ermöglicht durch das Einfügen eines DNA-Segments zwischen regulatorischer und kodierender Sequenz des Transgens, das sowohl Polyadenylierungssignal als auch Translationsstop enthält und von zwei gleichsinnig orientierten loxP-Stellen umrahmt ist. Erst nach cre-vermittelter Deletion der „Stop-Kassette“ kann das Transgen exprimiert werden. Mit diesem Ansatz konnte eine Stop-Kassette zwischen dem murinen α -A-Kristallin-Promotor und der Tag-kodierenden Sequenz entfernt und so Tumorentwicklung in der Linse des Auges induziert werden (Lakso *et al.*, 1992; Pichel

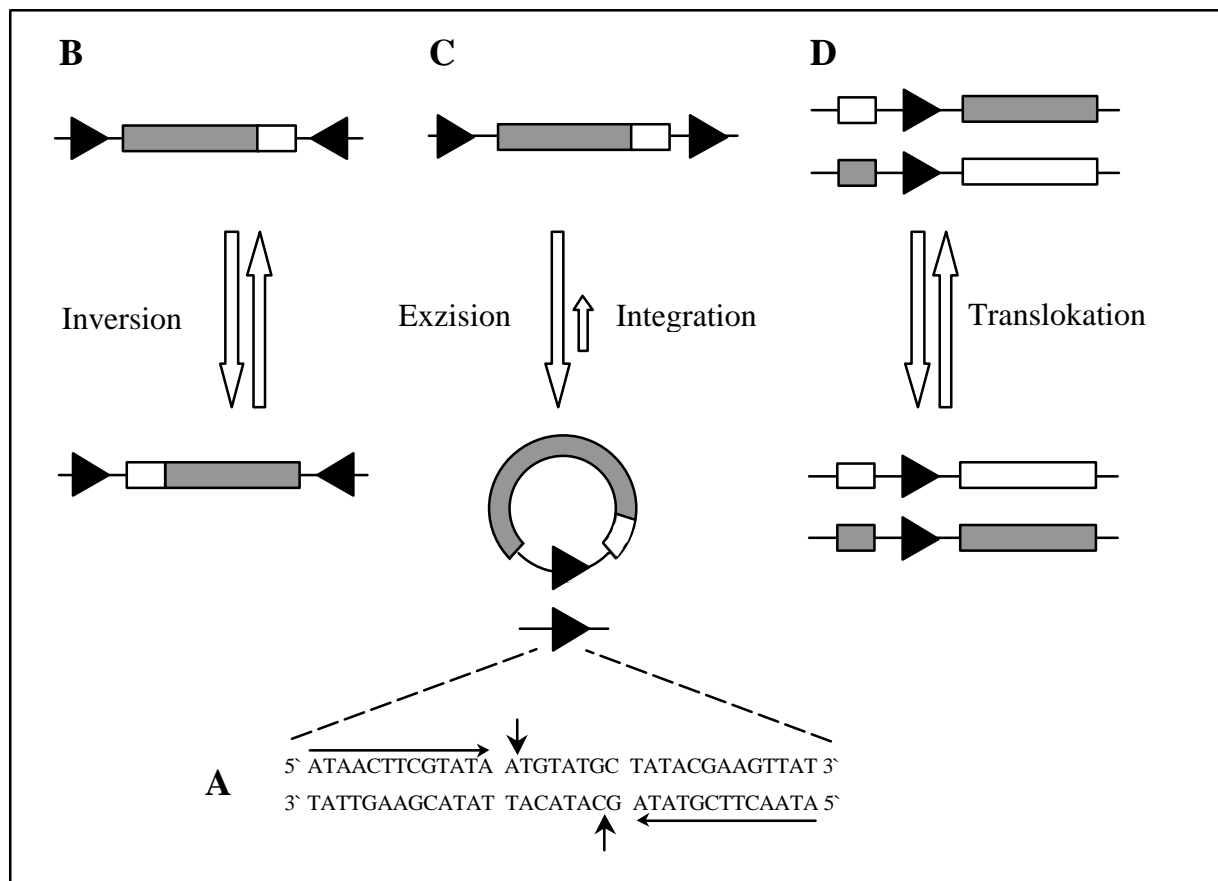


Abb. 1 : Das cre/loxP-Rekombinations-System.

A) Eine loxP-Sequenz besteht aus 34 Basenpaaren (Bp). Die 8 Bp lange asymmetrische Kernsequenz wird von zwei je 13 Bp langen invertierten Sequenzen (horizontale Pfeile) flankiert. Die beiden vertikalen Pfeile geben die Schnittstellen der cre-Rekombinase an. B) Rekombination zwischen 2 loxP-Stellen, die in *umgekehrter* Orientierung im gleichen DNA-Molekül (intramolekulare Rekombination; cis) orientiert sind, führt zu Inversion des dazwischenliegenden DNA-Abschnitts während C) gleiche Orientierung der loxP-Stellen Exzision des flankierten DNA-Abschnitts als zirkuläres Produkt zur Folge hat. Wenn zwei loxP-Stellen auf zwei verschiedenen DNA-Molekülen liegen (intermolekulare Rekombination; trans) kann Rekombination entweder zu C) Integration oder D) Translokation führen.

et al., 1993). Diese geflochten Tiere wurden dazu mit Mäusen verpaart, die cre-Rekombinase schon früh in der Embryogenese ubiquitär exprimieren. Das Zielkonstrukt ist deswegen in allen Organen der Maus rekombiniert und die Tag-Synthese in der Linse beginnt schon früh in der Ontogenese. Auch der umgekehrte Ansatz ist realisiert. Das heißt, das geflochte Gen steht unter der Kontrolle eines ubiquitären (CMV, β -Aktin, HSV-Thymidinkinase) und cre unter der eines gewebsspezifischen Promotors. Da die Zahl gewebsspezifischer Cre-Mäuse immer weiter ansteigt, kann mit einer einzigen ubiquitären geflochten Maus eine ganze Reihe doppeltransgener Tiere generiert werden, die das Zielgen cre-abhängig gewebsspezifisch exprimieren. Hier zeigt sich der modulare Charakter des cre/loxP-Systems. Die vorhandenen gewebsspezifischen cre-Mäuse erlauben mittlerweile spezifische Rekombination in T-Lymphozyten (Gu *et al.*, 1994), B-Lymphozyten (Rickert *et al.*, 1997) und Makrophagen (Takeda *et al.*, 1999), im Nervensystem (Tsien *et al.*, 1996), in β -Zellen des Pankreas (Postic

et al., 1999), in der Leber (Postic *et al.*, 1999), in Keratinozyten (Tarutani *et al.*, 1997), im Muskel (Wang *et al.*, 1999; Miniou *et al.*, 1999) und anderen Zelltypen. Einen groben Überblick über bereits gemachte oder geplante cre-Mäuse gibt ein Übersichtsartikel (Metzger und Feil, 1999) und eine Datenbank im Internet (www.mshri.on.ca/nagy/cre.htm).

Soll die Deletion der Stop-Kassette erst im adulten Tier erfolgen, muß der Zeitpunkt der cre-Rekombination bestimmbar sein. Das ist möglich über die Regulation der Expression, Aktivierung oder Applikation der cre-Rekombinase. Cre-Expression kann mit Hilfe von induzierbaren Promotoren reguliert werden. Zum Beispiel kann cre, das unter der Kontrolle des Mx1-Promotors steht, durch die Injektion von IFN- α , - β oder polyI:C induziert werden. Der Promotor weist jedoch keine ausgesprochene Gewebespezifität auf und führt somit zu Rekombination in nahezu allen Organen. Die Gewebespezifität wird bestimmt, durch die Verpaarung der cre-Maus mit einer Reportermaus, die nach Deletion einer Stop-Kassette leicht detektierbare Reportermoleküle (β -Galaktosidase, Alkalische Phosphatase) exprimiert (Akagi *et al.*, 1997; Michael *et al.*, 1999; Soriano, 1999; Lobe *et al.*, 1999; Mao *et al.*, 1999). Die zweite Möglichkeit Rekombination zu regulieren besteht in der zeitlich bestimmaren Aktivierung von cre. Hierzu machte man sich einen natürlichen Regulationsmechanismus zunutze. Steroidhormonrezeptoren, die über ihre Ligandbindedomäne (LBD) an den ubiquitären Hitzeschockprotein-90-Komplex (Hsp90c) im Zytosol binden, lösen sich nach Steroidbindung an LBD, vom Hsp-Komplex ab, wandern in den Kern und üben dort ihre genregulatorische Funktion aus (Abb. 2). Wird nun cre auf genetischer Ebene mit einer LBD fusioniert wird es ebenfalls nach Steroidapplikation in den Nukleus transloziert und kann dort loxP-Stellen rekombinieren. Durch mutierte LBDen konnte sichergestellt werden, daß nur synthetische und nicht endogene Steroide binden und cre aktivieren können. So bindet der Östrogen-Antagonist Tamoxifen, aber nicht Östrogen selbst, an die mutierte LBD des Östrogen-Rezeptors (ER). Das gleiche gilt für das synthetische Steroide RU486 im und der LBD des Progesteronrezeptors (PR) bzw. RU38486 und der LBD des Glukokortikoidrezeptors (GR). Mittlerweile existieren mehrere Steroid-induzierbare cre-Mäuse. Über Tamoxifen kann cre im Nervensystem (Danielian *et al.*, 1998), in B-Zellen (Schwenk *et al.*, 1997), in Keratozyten (Vasioukhin *et al.*, 1999; Indra *et al.*, 1999) oder ubiquitär (Feil *et al.*, 1996; Brocard *et al.*, 1997) aktiviert werden. RU486 induziert in zwei Mauslinien gehirnspezifische cre-Aktivierung (Kellendonk *et al.*, 1999).

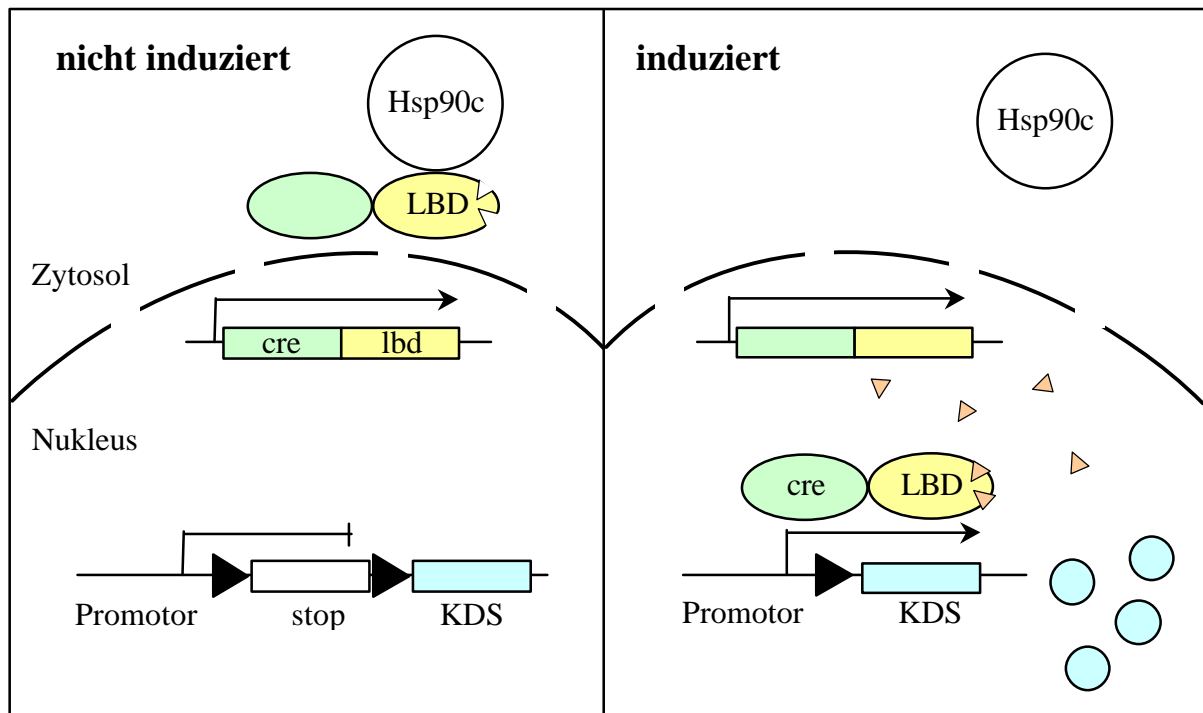


Abb. 2 : Prinzip der zeitlich gesteuerten Deletion eines Gens.

Durch Kreuzung einer cre-Maus mit einer loxP-Maus wird eine Situation erzeugt, in der ein crelbd-Fusionsgen und ein Zielgen mit Stop-flankierenden loxP-Stellen gemeinsam in allen Zellen der Maus vorliegen. Obwohl das CreLBD-Fusionsprotein exprimiert wird (abhängig vom Promotor vor dem crelbd-Gen in der gesamten Maus oder nur in einzelnen Geweben), kann das Fusionsprotein das Zielgen nicht rekombinieren, weil es durch Bindung an den zellulären Hsp90-Komplex inaktiviert ist (links). Wird von außen ein Induzierer verabreicht, so löst sich das CreLBD-Fusionsprotein vom Hsp90-Komplex, und kann das Zielgen rekombinieren (rechts). Die deletierte Stop-Kassette ist nicht eingezeichnet. Abkürzungen: crelbd: crelbd-Fusionsgen; CreLBD: Fusionsprotein aus Cre-Rekombinase und mutierter Ligandenbindedomäne eines Steroidrezeptors; KDS: kodierende Sequenz des Zielgens; stop: Polyadenylierungssignal und Translationsstopcodon; blaue Dreiecke: Zielprotein; braune Dreiecke: Steroid; schwarze Dreiecke: loxP-Stellen.

Die dritte Möglichkeit cre-vermittelte Rekombination zeitlich zu bestimmen, ist die *Applikation* von cre-Rekombinase zu einem definierten Zeitpunkt. Ein gutes Beispiel dafür ist die Infektion von geflochtenen Tieren mit rekombinanten adenoviralen Vektoren, die für Cre kodieren. So konnte sowohl in der Leber (Lee *et al.*, 1997; Rohlmann *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 1999b) als auch im Kolorektum (Shibata *et al.*, 1997) cre-vermittelte Rekombination induziert werden. Es konnte in Reportermäusen gezeigt werden daß durch intravenöse Injektion eines cre-kodierenden adenoviralen Vektors vorwiegend in der Leber aber auch in anderen Organen wie Herz, Lunge, Pankreas, Darm, Muskel und Niere Rekombination stattfindet (Akagi *et al.*, 1997). Die hohe anfängliche Expression des Reportergens in der Leber sinkt jedoch von 65% innerhalb der nächsten 60 Tage aufgrund einer starken zellulären Immunreaktion auf unter 1% ab. Besteht Interesse an langfristiger Expression des induzierten Produkts scheinen virale Vektoren aufgrund der hohen Immunogenität somit ungeeignet.

II. Fragestellung

Im Thymus wird ein Großteil autoreaktiver T-Zellen durch negative Selektion eliminiert. Da nicht alle Antigene im Thymus bzw. erst spät in der Entwicklung des Organismus exprimiert werden, gelangen autoreaktive T-Zellen in die Peripherie. Obwohl periphere Toleranzmechanismen existieren, besteht doch immer die Gefahr, daß autoreaktive T-Zellen aktiviert werden und Gewebeschäden verursachen. Unser System ist ein Beispiel dafür, wie Autoantigene und autoreaktive T-Zellen ohne Anzeichen von Autoimmunität koexistieren können.

Mäuse, die unter der Kontrolle des Albumin- oder C-reaktiven-Protein- (CRP) Promotors das MHC-Klasse I Molekül H-2K^b auf Hepatozyten und außerdem den K^b spezifischen TZR (DesTZR) auf T-Zellen exprimieren, sind funktionell tolerant und stoßen K^b-positive Tumortransplantate nicht ab. Auch nach Aktivierung der K^b-spezifischen T-Zellen *in vivo* durch Injektion eines Tumors, der neben K^b auch IL-2 sezerniert, führt dies zu keiner Autoaggression gegenüber Lebergewebe, obwohl dieselben Tiere K^b-positive Transplantate abstoßen. Erst nach einer zusätzlichen Infektion der Leber mit dem Bakterium *Listeria monocytogenes* infiltrieren und attackieren die aktivierten T-Zellen K^b-tragendes Lebergewebe. Ob es sich bei dem beschriebenen Leberschaden ausschließlich um eine Autoaggression handelt, oder ob der transgene DesTZR mit einem von Listerien stammenden Peptid auf K^b kreuzreagiert, ein Vorgang der als *molekulare Mimikry* bekannt ist, war bisher unklar.

Im ersten Teil der Arbeit sollte daher der Einfluß von Entzündungsprozessen auf die T-Zell-vermittelte Zerstörung körpereigenen Gewebes untersucht werden. Dazu boten sich sogenannte CpG-Oligodeoxynukleotide (CpG-ODN) an, die neben systemischen Effekten auch eine Entzündungsreaktion in der Leber induzieren, ohne eine antigenspezifische Immunantwort hervorrufen zu können. Kreuzreaktivitäten, wie bei Infektionen mit komplexen Erregern (molekulare Mimikry), sind daher ausgeschlossen.

Die Anwesenheit selbstreaktiver T-Zellen in der Peripherie birgt jedoch nicht nur das Risiko der Entstehung von Autoimmunerkrankungen – den unerwünschten Immunreaktionen gegen *gesundes* körpereigenes Gewebe - sondern weckt auch die Hoffnung erwünschte Immunreaktionen gegen *malignes* Selbst (Tumoren) induzieren zu können. Befunde der letzten Jahre haben gezeigt, daß die meisten Tumoren Antigene exprimieren, die von CD8-positiven T-Zellen erkannt werden können. Obwohl in klinischen Studien tumorspezifische T-Zellen erfolgreich aktiviert werden konnten, führte dies nur sporadisch zur Eliminierung des

Tumors. Im Unterschied dazu führt die Aktivierung von T-Zellen zahlreichen Mausmodellen jedoch zu Abstoßung des Tumors. In diesen Systemen wurden jedoch vorwiegend Transplantationstumoren verwendet. Transplantationstumoren entstehen durch das Auswachsen von Tumorzellen, die als Suspension vollständig transformierter Zellen meist subkutan appliziert werden und somit nur ein schlechtes System für primäre humane Tumoren darstellen. Außerdem kann die Injektion von Tumorzellen zu lokalen Entzündungen an der Einstichstelle führen, die eine Immunantwort gegen Transplantationstumoren begünstigen. Aus diesem Grund möchten wir ein Tumorsystem entwickeln, das der klinischen Situation näher kommt.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte somit ein Lebertumormodel in der Maus etabliert werden, bei dem der Tumor nicht injiziert wird, sondern am Ort der Entstehung auswächst (autochthoner Tumor). Auch die Entstehung einer Entzündung soll bei der Induktion des Tumors vermieden werden.

Autochthone Tumoren entstehen auf schnelle und zuverlässige Weise durch die gewebespezifische transgene Expression von Onkogenen. Ihr Nachteil besteht darin, daß alle Zellen des Gewebes das Onkogen exprimieren und somit potentiell transformieren können. Eine Situation die im Patienten nicht anzutreffen ist und eine erfolgreiche Behandlung im Mausmodell erheblich erschwert. Das Tumorsystem sollte gewährleisten, daß nur ein begrenzter Anteil der Gewebezellen das Onkogen exprimiert. Dies möchten wir durch die Verwendung des cre/loxP-Systems realisieren, mit dessen Hilfe Onkogene räumlich und zeitlich definiert angeschaltet werden können.

Ziel des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit war somit die Etablierung eines induzierbaren autochthonen Lebertumormodels in der Maus mit Hilfe des cre/loxP-Systems, um die Rolle von T-Zell-Aktivierung und Entzündungsreaktion in der Tumorummuntherapie untersuchen zu können.

III. Material und Methoden

A. Material

1. Bezugsquellen

1.1. Chemikalien

Es wurden Chemikalien und Grundsubstanzen von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Gibco-BRL (Eggenstein), und Roth (Karlsruhe) bezogen.

1.2. Enzyme

Der weitaus überwiegende Teil der Restriktionsenzyme und anderer DNA/RNA modifizierender Enzyme wie T4 DNA-Ligase, CIP (calf intestine phosphatase), Klenow-Enzym, T4-DNA-Polymerase, DNase, RNaseA, Reverse Transcriptase wurde von der Firma MBI Fermentas (Vilnius, Litauen) bezogen. Vereinzelt wurden Enzyme der Firmen Roche (Mannheim), Promega (Mannheim), New England Biolabs (Bad Schwalbach), Stratagene (Amsterdam, Niederlande) und Gibco BRL (Eggenstein) verwendet.

1.3. Gebrauchswaren

Die Plastikartikel für die Zellkultur und die molekularbiologischen Arbeiten wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Gilson (Villiers le Bel, Frankreich), Greiner (Frickenhäusen), Falcon (Becton Dickinson), Nalgene, Nunc, und Renner (Darmstadt) bezogen.

2. Verwendete Kits

DNA Labelling and Detection Kit-Nonradioactive (Boehringer)	Digoxigenin-Markierung von DNA zur Verwendung als Sonde zur Hybridisierung
Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen)	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen über Säulchen
RNeasy Total RNA Kit (Qiagen)	Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebekompositen über Säulen
Expand High Fidelity PCR System (Boehringer Mannheim)	PCR-Reaktionen bis zu 5 kb mit geringer Fehlerrate durch proofreading-Aktivität einer beigefügten Pwo-Polymerase

3. Geräte

Brutschrank 3029	Forma Scientific
Elektrophoresekammern Easy Cast	MWG Biotech GmbH (Ebersberg)
Eismaschine Wessamat	Zugck (Leimen)
FACScan	Becton Dickinson
Flüssigstickstoff-Lagerbehälter	Messer Griesheim (Düsseldorf)
Fluoreszenz-Mikroskop Axiophot 2	Zeiss
Gamma-Strahlungsmeßgerät Cobra	Packard (Dreieich)
Gefriertrockner Alpha 1-2	Christ (Osterode)
Gewebehomogenisator PolytronPT 2100	Kinematica
Kaltlichtlampe KL 1500-Z	Schott (Göttingen)
Kryostat 2800 Frigocut E	Reichert-Jung
Kühlzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus (Osterode)
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr; Bosch
Lumi-Imager	Boehringer Mannheim
Magnetrührer, Heizplatte MR 3002	Heidolph
Mikroskop	Olympus
PCR-Block Peltier Thermal Cycler 200	MJ Research Inc. (Watertown, USA)
pH-Meter 761 Calimetric	Knick
Photometer Ultraspec 2000	Pharmacia Biotech
Rotationsverdampfer	Heidolph
Schüttelinkubator Incubator Shaker 6725	New Brunswick Scientific GmbH
(Schüttel-)Wasserbad	Köttermann (Hänigsen)
Schüttler HS 501 digital	IKA Labortechnik; Janke+Kunkel
Spannungsgeräte Biometra P25	Biotron (Göttingen)
Stereolupe	Leitz
Sterilbank Biogard Hood	Baker Company Inc. (Maine, USA)
Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus (Osterode)
Ultraschallgerät Sonofier 250	Branson (Connecticut, USA)
UV-Flächenstrahler	Konrad Bender (Wiesloch)

Vakuumofen	Heraeus (Osterode)
Videografikdrucker UP 890CE	Hitachi
Waagen	Satorius (Göttingen); Mettler
Zentrifuge Minifuge 2	Heraeus Christ (Osterode)
Zentrifuge Omnifuge 2,0 S	Heraeus Sepatech (Osterode)
Zentrifuge TJ-6	Beckmann (Palo Alto, CA, USA)
Zentrifuge Sorvall RC5C Plus	Kendro

4. Puffer und Lösungen

In der Regel wurden die Lösungen mit doppelt deionisiertem und autoklaviertem Wasser angesetzt. Für die Elektrophoresepuffer genügte einfach deionisiertes Wasser. Bei Lösungen, die als konzentrierte Stammlösung angesetzt werden, ist der Konzentrationsfaktor in Klammern angegeben. Lösungen, die feucht autoklaviert werden (121°C, 25 min) sind mit * gekennzeichnet. Bei Lösungen, die nicht bei Raumtemperatur aufbewahrt werden, ist die Temperatur in Klammern angegeben. Die Prozentangaben beziehen sich sofern nicht anders angegeben auf Gewicht pro Volumeneinheit (w/v).

BCIP-Lösung : 50 µg/ml in 70 % DMF/H₂O

CIP-Puffer (10x) (-20°C) : 100 mM Tris/HCl pH 7.5; 100 mM MgCl₂

Denaturierungslösung : 0.5 M NaOH; 1 M NaCl

Denhardt's (-20°C)* : 1% Ficoll; 1% BSA; 1% Polyvinylpyrrolidon

dNTP-Mix (10x) (-20°C) : 2 mM dATP; 2 mM dTTP; 2 mM dCTP; 2 mM dGTP

Fixierlösung B : 2% Formaldehyd; 0.2% Glutaraldehyd

Gewebepuffer (Southern Blot) : 100 mM Tris/HCl pH 8.5; 200 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0.2% SDS

Hybridisierungslösung (-20°C) : 5x Denhardt's; 4x SSPE; 1% SDS; 100µg/ml Heringssperma-DNA

KaAc/HCOOH-Puffer (4⁰C) : 3 M KaAc; 5% HCOOH

Ladepuffer (-20°C) : 0.1% Bromphenolblau; 0.1% Xylen Cyanol FF;
15% Glyzerol

Ligationspuffer (10x) (-20°C) : 500 mM Tris/HCl pH 7.5; 100 mM MgCl₂; 20 mM DTT;
20 mM Spermidin

Lysepuffer (Maxi) : 200 mM NaOH; 1% SDS

Neutralisierungslösung (SB):	0.5 mTris/HCl pH 7.4; 3 m NaCl
NaOH/SDS-Puffer :	200 mM NaOH; 1% SDS
NBT-Lösung :	75 mg/ml in DMF
PBS (10x)* :	1.3 M NaCl; 1 M Na ₂ HPO ₄ mit 1 M NaH ₂ PO ₄ auf pH7.0 eingestellt
PCR-Puffer (10x) :	100mM Tris (pH 8,3), 500mM KCl, 25mM MgCl ₂ -6H ₂ O
Prähybridisierungslsg.: (-4°C) :	2% Blockierungsreagenz (Boehringer) in Hybridisierungslsg.
Prälyse-Puffer (Maxi) :	50mM Glukose; 25mM TrisHCl (pH 8,0); 10mM EDTA
Puffer-1 (SB):	100 mM Tris/HCl pH 7.5; 150 mM NaCl
Puffer-2 (SB):	2% Blockierungsreagenz (Boehringer) in Puffer-2
Puffer-3 (SB):	100 mM Tris/HCl (pH 9.5); 100 mM NaCl; 50 mM MgCl ₂
Restriktionspuffer (-20°C)	
B ⁺ (10x) :	100 mM Tris/HCl (pH 7.5); 100 mM MgCl ₂ ; 1mg/ml BSA
G (10x) :	100 mM Tris/HCl (pH 7.5); 100 mM MgCl ₂ ; 500mM NaCl, 1mg/ml BSA
O ⁺ (10x) :	500 mM Tris/HCl (pH 7.5); 100 mM MgCl ₂ ; 1M NaCl, 1mg/ml BSA
R (10x) :	100 mM Tris/HCl (pH 8.5); 100 mM MgCl ₂ ; 1M KCl, 1mg/ml BSA
Y ⁺ /Tango (2x) :	66mM Tris-Azetat (ph 7,9); 20mM Mg-Azetat; 132 mM KaAzetat; 0,2mg/ml BSA
Rf 1 :	100 mM RbCl; 50 mM MnCl ₂ ; 30 mM KaAc; 10 mM CaCl ₂ ; 15% Glyzerin
RF 2 :	10 mM MOPS; 10 mM RbCl; 75 mM CaCl ₂ ; 15% Glycerin
SSC (20x) :	3 M NaCl; 0.3 M Natriumcitrat pH 7.0
SSPE (20x) :	3.6 M NaCl; 200 mM NaH ₂ PO ₄ ; 20 mM EDTA; mit NaOH pH auf 7.0
TAE (10x) :	400 mM Tris/HAc pH 7.4; 50 mM NaAc; 10 mM EDTA
TE (10x) :	100 mM Tris/HCl pH 8.0; 100 mM EDTA
Waschlösung :	0.3x SSC; 0.1% SDS

5. Medien

Die für die Zell- und Bakterienkultur verwendeten Medien und Medienzusätze wurden von den Firmen Gibco BRL (Eggenstein), Difco (Detroit/USA), Sigma (München) und Boehringer (Mannheim) bezogen.

5.1. Medien für Bakterien

LB-Medium: Trypton: 10 g/l
Hefeextrakt: 5 g/l
NaCl: 10 g/l

Antibiotika Stammlösungen: Amp⁵⁰ (50 mg/ml Ampicillin (Na-Salz) in H₂O)

Das LB-Medium für die Bakterienkultur wird mit deionisiertem H₂O angesetzt, der pH auf 7.5 eingestellt und anschließend autoklaviert (25 min, 121°C). Zum Gießen von Agarplatten wird dem Medium vor dem Autoklavieren 1.5% Agar zugesetzt, und der Bakterien-Agar nach dem Abkühlen auf Handwärme in 10cm Petrischalen gefüllt (ca. 20 ml/Schale). Die Platten werden mit leicht geöffnetem Deckel unter der Sterilbank stehen gelassen, bis der Agar erstarrt und ausreichend getrocknet ist. Für Selektiv-Medium bzw.-Agar wird nach dem Abkühlen auf ca. 60°C das entsprechende Antibiotikum aus der 1000x Stammlösung zugesetzt. Nicht sofort verwendete Platten können bei 4°C maximal 3 Monate gelagert werden.

5.2. Medien für die Zellkultur

Die Grundmedien werden durch Zugabe von Medienzusätzen aus in der Regel 100x Stammlösungen komplettiert. Das FCS wird vor Gebrauch 45 min bei 56°C erhitzt, um Komplementfaktoren zu inaktivieren. L-Glutamin ist instabil, und wird angesetztem Medium nach 2 Wochen erneut zugesetzt.

RPMI oder DMEM Standard-Medium:

RPMI 1640 oder DMEM (1000mg/l Glucose) (beides Gibco, Eggenstein)

<u>Zusatz</u>	<u>Endkonzentration</u>	<u>Hersteller</u>
FKS	10 %	(Gibco, BRL)
L-Glutamin (200mM)	2 mM	(Gibco, Eggenstein)
Na-Pyruvat (100mM)	1 mM	(Gibco, Eggenstein)
Pen/Strep (10000E/10mg/ml)	100 U/ml	(Linaris)
2-Mercaptoethanol (20µM)	0.1 mM	(Merck, Darmstadt)
Hepes (1M, pH 7,3)	10mM	

6. Bakterienstämme

DH1

294-Cre (Buchholz *et al.*, 1996): Stamm mit stabil integrierter Cre-Rekombinase, zum Testen der Rekombinationsfähigkeit von loxP-Stellen in Plasmiden

7. Mauslinien

	Name (MHC-Haplotyp)	Referenz
Inzuchtstämme	C57BL/6 (H-2 ^b) CBA (H-2 ^k) DBA/2 (H-2 ^d)	
Transgene Mauslinien	Alb-K ^b (H-2 ^d) CRP-K ^b (H-2 ^d) Ker-K ^b (H-2 ^d) Des-TZR (H-2 ^k) cre-deleter	Schönrich <i>et al.</i> , 1992 Ferber <i>et al.</i> , 1994 Schönrich <i>et al.</i> , 1992 Schönrich <i>et al.</i> , 1991 Schwenk <i>et al.</i> 1995

Die homozygoten einzeltransgenen Mäuse wurden mit CBA oder DBA/2 gekreuzt und hemizygot in den Experimenten eingesetzt (MHC-Haplotyp : H-2^{dxk}). Doppeltransgene (doppelhemizygote) Tiere wurden durch Kreuzung der oben aufgeführten homozygoten einzeltransgenen Mauslinien erhalten. Die Inzuchtlinien CBA, DBA/2 und C57BL/6 entstammen eigener Züchtung oder wurden von WIGA (Hannover), BRL oder Jackson Laboratories bezogen. Die transgenen Linien exprimieren das MHC Klasse I-Molekül unter der Kontrolle des Promotors des C-reaktiven Proteins (CRP-K^b) oder des Albumin-Promotors (Alb-K^b) auf Hepatozyten oder unter dem Keratin-IV-Promotor auf Keratinozyten (Ker-K^b). DesTZR-Tiere exprimieren einen transgenen TZR, der von dem K^b-spezifischen T-Zell-Klon KB5.C20 aus B10.BR (H-2^k) stammt, und K^b zusammen mit den Selbst-Peptiden B1 (KVITFIDL), B2 (KULHFYNV), B3 (KIITYRNL) oder INFDFNTI erkennt (Schmitt-Verhulst, persönliche Kommunikation). Die Antigene, von denen die Peptide abstammen sind nicht bekannt.

8. Antikörper

Antikörper	aus	Spezifität	Isotyp	Referenz
Désiré-1	Maus	α -K ^b -TZR (Maus)	IgG2a/ κ	Hua <i>et al.</i> , 1986
B20.2.2	Ratte	α -K ^b -TZR (Maus)	unbek.	Malissen, unveröffentlicht
Y3P	Maus	MHC Klasse I	IgG2a	Janeway <i>et al.</i> , 1984
P7/7	Ratte	I-A ^{b, d, f, k}	IgG2b	Momburg <i>et al.</i> , 1986
53-6.7	Ratte	CD8 α (Maus)	IgG2a	Ledbetter & Herzenberg, 1979
GK1.5	Ratte	CD4 (Maus)	IgG2b	Dialynas <i>et al.</i> , 1983
YN1/1.7.4	Ratte	ICAM-1	IgG2b	Prieto <i>et al.</i> , 1989
429	Ratte	VCAM-1	IgG2a	Bevilacqua <i>et al.</i> , 1993
H100.27.55	Maus	H-2K ^k (Maus)	IgG2a/ κ	Lemke <i>et al.</i> , 1979
K10.56-1	Maus	H-2K ^b (Maus)	IgG2b/ κ	Hämmerling <i>et al.</i> , 1982
K9-18	Maus	H-2K ^d (Maus)	IgG2a	Arnold <i>et al.</i> , 1985
C17.8	Ratte	IL-12p70 (Maus)	IgG2a	Wysocka <i>et al.</i> , 1995
C15.6	Ratte	IL-12p40 (Maus)	IgG1	Wysocka <i>et al.</i> , 1995

H100.27.55 und K9-18 wurden als FITC-Konjugate, K10.56-1 als FITC-Konjugat eingesetzt. Désiré-1 wurde *in vitro* als FITC-Konjugat und *in vivo* zur Depletion von α -K^b spezifischen T-Zellen ungekoppelt verwendet. 53-6.7 ist als PE-Konjugat zur Verwendung gekommen. C17.8 und C15.6 wurden *in vivo* zur Neutralisierung von IL-12 ungekoppelt eingesetzt.

9. PCR-Primer

Die folgenden PCR-Primer wurden entweder frei ausgewählt und um gewünschte Sequenzen erweitert, um zusätzliche Schnittstellen oder loxP-Stellen an den Enden einzuführen, oder sie wurden mit dem Computerprogramm Primer-Select aus dem Lasergene Software-Paket ausgewählt.

Primer zum Erstellen der DNA-Konstrukte :

5'floxstop (72-mer)	5'-AAGCTTGAATTCTCGCGAATAACTTCGT ATAGCATACATTATACGAAGTTATGGCCTGA ACTGCCAGCTGGC-3'
3'floxstop (84-mer)	5'-CTGCAGAATTCTCGCGATAACTTCGTAT AATGTATGCTATACGAAGTTATTACTTACCT GCATAAAAAACCTCCCACACCTCCC-3'

5'floxTaginvers (72-mer)	5'-GAATTCGTCGACGGTACCATAACTTCG TATAGCATACATTATACGAAGTTATCGCCTC GGCCTCTGAGCTAT-3'
3'floxTaginvers (78-mer)	5'-GAATTCCTCGAGTCTAGAATAACTTCGT ATAGCATACATTATACGAAGTTATAGACATG ATAAGATACATTGATGAGT-3'

Primer zum Nachweis von SV40Tag und β_2m in Schwanz-DNA :

β_2m -1 (22-mer)	5'-CACCGGAGAATGGGAAGCCGAA-3'
β_2m -2 (22-mer)	5'-TCCACACAGATGGAGCGTCCAG-3'
Tag-1 (26-mer)	5'-GGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTG-3'
Tag-2 (21-mer)	5'-CAGAGCAGAATTGTGGAGTGG -3'

Primer zum Nachweis von Rekombination von loxP Stellen im Mausgenom :

5'floxstop-del-Tag (19-mer)	5'-GTCGACGGTATCGATAAGC-3'
3'floxstop-del-Tag (19-mer)	5'-CAGAAGCCTCCAAAGTCAG-3'
ATI1 s (19-mer)	5'-GTGGGGGTGGGGTTAGAGG-3'
ATI2 s (24-mer)	5'-TAGAAGAATGGATGGCTGGAGTTG-3'
ATI2 as (24-mer)	5'-CAACTCCAGCCATCCATTCTTCTA-3'
ATI3 s (24-mer)	5'-GGGGAGTCCAGAGATTTGCCTTCA-3'
ATI3 as (24-mer)	5'-TGAAGGCAAATCTCTGGACTCCCC-3'

Folgende Primer wurden für die RT-PCR benutzt :

HGPRT1 (25-mer)	5'-GTTGGATCAAGGCCAGACTTTGTTG-3'
HGPRT2 (23-mer)	5'-GAGGGTAGGCTGGCCTATAGGCT-3'
SV6 (25-mer)	5'-GGAGTAAAATATGCTCATCAACCTG-3'
SV9 (24-mer)	5'-GTAGCCTCATCATCACTAGATGGC-3'
cre3 (19-mer)	5'-GACCAGGTTCGTTCACTCA-3'
cre4 (17-mer)	5'-TAGCGCCGTAAATCAAT-3'

10. CpG -haltige Oligodeoxynukleotide (ODN)

ODN 1668 : TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (Lipford *et al.*, 1997; Bendigs *et al.*, 1999)

ODN 1826 : TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (Walker *et al.*, 1999; Chu *et al.*, 1999)

ODN 1720 : TCC ATG AGC TTC CTG ATC CT (Lipford *et al.*, 1997; Bendigs *et al.*, 1999)

Alle 3 CpG-ODN wurden vollständig thioatstabilisiert, um die *in vivo* Halbwertszeit im Serum der Versuchstiere zu erhöhen. Die CpG-ODN wurden von TIB-MOLBIOL (Berlin) synthetisiert. Je 500nmol wurden für ca. 60 Minuten in 1ml ddH₂O gelöst (3,2µg/µl), dann aliquottiert und bei –20⁰C gelagert.

Je 40µg der verschiedenen CpG-ODNe wurden in 250µl PBS intraperitoneal in die Versuchstiere injiziert.

11. Lipide

Cholesterol (CH) Sigma, Deisenhofen

L-α-Phosphatidylcholin (PC) Sigma, Deisenhofen

Phosphatidylserin (PS) Sigma, Deisenhofen

Die Lipide wurden in Diethyl-Ether gelöst und bei –20⁰C aufbewahrt.

B. Methoden

1. Molekularbiologische Arbeitstechniken

1.1. Lagerung von Bakterien

Bakterienstämme werden auf (Selektiv-) Agarplatten ausgestrichen, 24 h bei 37°C bebrütet und bei 4°C aufbewahrt. Sie sind so einige Wochen haltbar. Zur langfristigen Lagerung werden 0.5 ml einer üN-Kultur mit 0.5 ml Glycerin gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Zur Entnahme wird mit einem sterilen Skalpell ein kleines Stückchen von den gefrorenen Bakterien geschabt und auf eine (Selektiv) Agarplatte ausgestrichen.

1.2. Präparation CaCl₂-kompetenter E. coli Zellen

Mit einer Einzelkolonie DH1 Zellen wird eine üN-Kultur in 50 ml LB Medium herangezogen. 400ml frisches LB Medium werden mit 10 ml der DH1 üN-Kultur angeimpft. Die Bakterien werden im Schüttelinkubator ca. 3 h bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0.3-0.5 wachsen gelassen, in 50 ml Falcon-Röhrchen aliquottiert und abzentrifugiert (2500 Upm, 10 min, 4°C). Alle folgenden Arbeiten werden steril und bei 4°C im Kühlraum durchgeführt. Die Pellets werden in je 16.5 ml eiskaltem, frisch hergestelltem Rf 1 resuspendiert. Die Suspension wird 20 min auf Eis inkubiert, und die Zellen erneut abzentrifugiert (2500 Upm, 10 min, 4°C), in je 4 ml Rf 2 resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Fraktionen werden gepoolt (gesamt 32 ml) und mit gekühlten Pipettenspitzen nach Wunsch in 1.5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert. Die kompetenten Zellen werden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Eine Testtransformation mit 1 ng doppelsträngiger, zirkulärer Plasmid-DNA auf 100 µl kompetente Zellen sollte mehr als 3x10³ Kolonien ergeben.

1.3. Transformation von kompetenten E. coli Zellen

Ein Aliquot (50 µl) eingefrorene kompetente Zellen wird für zehn Minuten auf Eis aufgetaut, mit einem Drittel (7µl) eines Ligationsansatzes gemischt und für eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wird der Transformationsansatz für 2 min bei 42°C einem

Hitzeschock ausgesetzt und nach 2 Minuten bei 4°C auf eine (Selektiv-)Agarplatte ausplattiert.

1.4. DNA-Minipräparation (alkalische Lyse)

Der Deckel eines 1.5 ml Reaktionsgefäßes wird mit einer Kanüle durchstoßen und mit 1 ml Selektivmedium gefüllt. Das Medium wird mit einer Bakterienkolonie angeimpft und im Schüttelinkubator üN bei 37°C inkubiert. Die Bakterien werden abzentrifugiert (5 min, 13000 Upm) und in 150 µl Prälyse-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 300µl Lyse-Puffer und 5 min Inkubation auf Eis werden die Zellen lysiert und bilden einen klaren Schleim. Die Zugabe von 250 µl KAc/HCOOH-Puffer führt zur sofortigen Neutralisierung der Lösung, wodurch Proteine und genomische DNA vernetzt ausfallen. Nach 15 min Inkubation auf Eis wird die Probe abzentrifugiert (5 min, 13000 Upm) und aus dem in ein neues Reaktionsgefäß überführten Überstand die Plasmid-DNA mit 400µl Isopropanol gefällt (5 min, RT). Die Plasmid-DNA wird abzentrifugiert, (5 min, 13000 Upm), das Pellet an der Luft getrocknet und in 30 µl TE gelöst. Zur Degradierung von verunreinigender RNA wird 0.5 µl RNase (10mg/ml) zur Plasmid-DNA pipettiert. Für einen analytischen Verdau wird 1 µl der Plasmid-DNA verwendet.

1.5. DNA-Maxipräparation (alkalische Lyse)

Benötigt man eine größere Menge von sauberer und oft verwendeter Plasmid-DNA so wird eine Maxipräparation aus Bakterien gemacht. Dazu werden 100-200 ml Selektivmedium mit einer Einzelkolonie angeimpft und üN im Schüttelinkubator bei 37°C in einem 1000ml Kolben inkubiert. Die Bakterienkultur wird geerntet (5 min, 6000 Upm, 4°C), und das Bakterienpellet in 6 ml Prälyse-Puffer in 50 ml Falconröhrchen resuspendiert. Die Bakterien werden durch Zugabe von 14 ml Lyse-Puffer lysiert (5 min, 4°C). Die Zugabe von 10,5 ml KAc/HCOOH-Puffer unter mehrmaligem Schwenken führt zur sofortigen Neutralisation der Lösung, wodurch Proteine und genomische DNA vernetzt ausfallen. Nach 15 min Inkubation auf Eis wird die Probe abzentrifugiert (5 min, 6000 Upm) und der Überstand durch einen locker mit Glaswolle gestopften Trichter filtriert. Aus dem Überstand wird die Plasmid-DNA mit 0.6 Volumen Isopropanol gefällt (5 min, RT) und abzentrifugiert (5 min, 6000 Upm). Das Pellet wird in 4 ml TE resuspendiert und weiter aufgereinigt indem 4 ml 4 M LiCl zupipettiert und nach der Fällung von Verunreinigungen (5 min, 4°C) erneut abzentrifugiert wird (5 min, 6000 Upm). Die Plasmid-DNA im Überstand wird anschließend mit 20 ml eiskaltem 100% igem Ethanol gefällt (15 min, -20°C), abzentrifugiert (5,min, 6000 Upm), mit 70 % Ethanol

gewaschen und in 1 ml TE aufgenommen. In einem 1.5 ml Reaktionsgefäß werden 5 µl RNase (10 mg/ml) zugegeben und die RNA verdaut (30 min, 37°C). Nach Salzzugabe (8µl 4M NaAc pH5.6 pro 100 µl DNA-Lsg.) wird die Plasmid-DNA 3x mit Phenol/Chloroform und 2x mit Chloroform extrahiert, mit Isopropanol gefällt und mit 70 % 2-Propanol gewaschen. Das getrocknete (15min, 37°C) Pellet wird in 0.1-1 ml TE aufgenommen. Die Präparation liefert ca 0.5-2 mg Plasmid-DNA.

1.6. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Spektroskopische Konzentrationsbestimmung: Die Basen der DNA und RNA haben ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, das zu Konzentrationsbestimmung von nukleinsäurehaltigen Lösungen benutzt werden kann. Das Spektrum einer 1:200 Verdünnung wird im Bereich 300-220 nm gegen H₂O gemessen. Die Extinktion sollte zwischen 0.1-1.5 liegen, da in diesem Bereich Extinktion und Nukleinsäurekonzentration proportional zueinander sind. Zur Umrechnung gilt:

$$1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ µg dsDNA/ml}$$

$$1 \text{ OD}_{260} = 40 \text{ µg ssDNA/ml}$$

$$1 \text{ OD}_{260} = 33 \text{ µg ssOligonukleotide/ml}$$

Da die aromatischen Aminosäurereste in Proteinen bei 280 nm absorbieren, kann eine Verunreinigung der isolierten Nukleinsäuren nach der Warburgschen Formel ($(1.45 \times \text{OD}_{280}) - (0.74 \times \text{OD}_{260}) = \text{mg Protein/ml}$) berechnet werden. Der Quotient $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ einer sauberen DNA-Präparation sollte bei 1.8 liegen.

Konzentrationsbestimmung über Vergleich mit Markerbanden im Gel: Die Methode liefert einen Schätzwert, gibt dafür aber Auskunft über die Plasmid- bzw. Fragmentgröße und Nukleinsäureverunreinigungen wie RNA und chromosomale DNA.

Eine definierte Markermenge 1 µg 1kb-Leiter (Gibco) und 1-5 µl Probe werden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Intensitäten von Probe und Referenzbande unter UV-Licht verglichen. Die 1.6 kb-Bande dient als Anhaltspunkt, sie enthält 10 % der aufgetragenen Marker-DNA, d.h. 100 ng.

1.7. Phenol-Chloroform-Extraktion nukleinsäurehaltiger Lösungen

Die Methode dient der Abtrennung von verunreinigenden Proteinen aus einer nukleinsäurehaltigen Lösung.

Zu der DNA-Lösung wird 1 Vol. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) gegeben, und kräftig gemischt, bis sich eine Emulsion bildet. Die Emulsion wird zentrifugiert (13000 Upm, 2 min, RT) und die obere wässrige Phase ohne das weiße Proteinpräzipitat in der Interphase in ein neues Reaktionsröhrchen gegeben. Die Lösung wird nun wie oben beschrieben mit 1 Vol. Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Um die von Protein gereinigte DNA zu isolieren, wird die DNA aus der wässrigen Phase über eine Ethanol-fällung präzipitiert und in TE aufgenommen. Für die Extraktion von RNA-haltigen Lösungen wird ein spezielles Phenol mit anderem pH verwendet.

1.8. DNA-Präzipitation

Ethanol-fällung: Zu nukleinsäurehaltigen Lösungen werden 1/10 Volumen 3 M NaAc (pH 6.0) und 2 Vol. Ethanol gegeben. Nach gründlichem Mischen wird für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend abzentrifugiert (13000 Upm, 10 min). Das Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen (2 min, RT), erneut abzentrifugiert (13000 Upm, 5 min), getrocknet (Heizblock 37°C, 5 min) und in TE aufgenommen.

Isopropanol-fällung: Die Fällung erfolgt im Prinzip wie oben beschrieben. Nach Zugabe von 3 M NaAc (pH 6.0) wird jedoch das 0.7-fache Vol. Isopropanol zugegeben, gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Sedimentation, Waschen und Trocknen, der DNA werden wie bei der Ethanol-fällung durchgeführt.

1.9. Restriktionsverdau

Für analytische Zwecke werden 1 µg Plasmid-DNA mit 1-5 U Restriktionsenzym in einem Volumen von 20 µl für mindestens 1 h bei 37°C inkubiert. Zur Präparation von Fragmenten wurden in einem Volumen von 50 µl 10 µg DNA mit 10 U Restriktionsenzym 3 h bis üN bei 37°C verdaut. Ansätze mit Enzymen, die bei abweichenden Temperaturen schneiden (z.B. SmaI bei 30°C) werden bei diesen Bedingungen inkubiert. Gemäß den Pufferansprüchen der Enzyme werden die Restriktionsverdau in verschiedenen Puffertypen (Blue, Red, Green, Yellow und spezielle Puffer für einzelne Restriktionsenzyme) durchgeführt. Genomische DNA wurde immer üN mit zusätzlich 5mM Spermidin verdaut.

1.10. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Mittels Schleudersäulchen (Qiaquick spin columns): Die DNA-Bande wird bei 366 nm unter dem UV-Transilluminator aus dem Gel geschnitten, gewogen und in 300 µl QG/100 µg Gel vollständig aufgelöst (50°C, 10 min Schütteln). Die Probe wird auf ein Schleuder-

säulchen in einem 2 ml Abfallröhrchen gegeben und zentrifugiert (13000 Upm, 1 min). Die Säule wird mit 750µl PE gewaschen (13000 Upm) und durch eine zweite Zentrifugation getrocknet (13000 Upm/1 min). Das Fragment wird mit 50 µl EB von der Säule gelöst (20 min RT), und das Fragment in eine 1.5 ml Reaktionsgefäß eluiert (13000 Upm, 1 min). Zur Kontrolle werden 5µl des Fragments auf einem Gel analysiert.

Mittels Elektroelution : DNA, die für eine Mikroinjektion in Zygoten zur Herstellung transgener Mäuse vorgesehen ist, wird mittels Elektroelution extrahiert, die eine höhere Reinheit aufweist. Das Gelstück mit der gewünschten DNA-Bande wird in ein TAE-gefülltes Glasröhrchen des Obergefäßes der Elektroelutionsapparatur blasenfrei transferiert, das am unteren Ende mit Hilfe eines Gummiringes durch ein DEAE-Papier verschlossen ist (geschützt durch einen Dialyseschlauch). Das Obergefäß (mit der Kathode) wird auf das Untergefäß (enthält Anode) gesetzt, beide Kammern mit TAE-Puffer gefüllt und die DNA aus dem Gel auf das DEAE-Papier transferiert (200V, 10-12 min., 10-12 mA pro Glasröhrchen). Das DEAE-Papier wird entnommen, für 30 min bei RT getrocknet und für 20 Sek. in 100% Ethanol geschwenkt. Nach 10 minütigem Trocknen wird das Papier für 20 Sek. in TE (pH 8,0) geschwenkt und erneut für mind. 30 Min. getrocknet. Nach einem zweiten Waschschrift in 100% Ethanol wird das trockenen DEAE-Papier auf den DNA-enthaltenden Teil zurechtgeschnitten und in ein 0,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß (mit einem Loch im Boden) gegeben, das auf ein deckellooses 1,5ml Eppendorfreaktionsgefäß gesetzt wird. Das Papier wird mit 30µl 1,5M NaCl in TE beträufelt, beide Gefäße mit Parafilm abgedichtet und für 30 min in einem 65⁰C Wasserbad inkubiert. Nach einem schnellen Zentrifugieren wird dieser Elutionsschritt wiederholt und das Endvolumen von 50µl mit 70µl H₂O verdünnt, um ein Ausfallen des Salzes bei der nachfolgenden Ethanol-fällung zu verhindern, die mit 300µl eiskaltem 100% Ethanol für 15 min. bei -80⁰C erfolgt. Nach der Zentrifugation (13000rpm, 3 min, 4⁰C) wird der Überstand verworfen und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet lässt man für 37⁰C bei RT trocknen und nimmt es dann in 50µl Mikroinjektionspuffer auf. 5µl werden auf ein 1% Agarosegel aufgetragen und daraufhin die DNA-Konzentration auf 2-6ng/µl eingestellt. Nach dem Sterilfiltrieren durch einen 0,22µm Porenfilter kann die DNA in befruchtete Eizellen injiziert werden.

1.11. Ligation von DNA-Enden

Bei der Ligation von zwei DNA-Fragmenten zu einem zirkulären Produkt wird das Insertfragment in einem 3-fachen Überschuß zum dephosphorylierten Vektorfragment (50-

100 ng) eingesetzt. Die Ligation erfolgt in Ligationspuffer mit 5 U T4-Ligase für 1-15 h bei RT in einem Volumen von 15 µl. Die Hälfte eines Ligationsansatzes wird zur Transformation verwendet.

1.12. Dephosphorylierung von DNA-Enden

Um eine Selbstligation von geöffneten Vektoren zu verhindern, wird die 5'-Phosphatgruppe an den DNA-Enden durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase (CIP; Calf Intestine Alkaline Phosphatase) entfernt. In der Regel wird nach Ende des präparativen Restriktionsverdau 1-10 U CIP pro µg DNA direkt in den Verdau pipettiert und für 30 min weiter bei 37°C inkubiert. Ein Entfernen der CIP ist nicht nötig, wenn der Verdau über ein Gel gereinigt wird. In Fällen, in denen dies nicht ausreichend ist, wird die DNA mit Ethanol gefällt, in 20 µl CIP-Puffer aufgenommen und mit 1-10 U CIP pro µg DNA für 1 h bei 37°C inkubiert. Die CIP kann alternativ zum Gel durch 20 min Erhitzen auf 70°C deaktiviert und anschließende Ethanolfällung entfernt werden. Die vollständige Dephosphorylierung wird über eine Kontrolligation des Vektorfragments getestet, es dürfen nur sehr wenige Bakterienkolonien wachsen.

1.13. Auffüllen und Abdauen überhängender DNA-Enden

Überhängende 5'-Enden: Um für bestimmte Ligationen glatte Enden (blunt ends) zu erzeugen, werden bei 5'-Überhängen die auf dem Gegenstrang fehlenden Basen aufgefüllt. Dazu werden direkt im Anschluß an den präparativen Verdau dNTPs (Endkonzentration 0.2 mM/dNTP) und Klenow-Polymerase (2-5 U/µg DNA) zum Verdau pipettiert und 10 min bei RT inkubiert.

Überhängende 3'-Enden: Zur Herstellung von glatten Enden wird hier das überstehende 3'-Ende durch die Exonukleaseaktivität der T4-Polymerase abgedaut. Dazu werden direkt im Anschluß an den präparativen Verdau dNTPs (Endkonzentration 0.2 mM/dNTP) und T4-Polymerase (2-5 U/µg DNA) zum Verdau pipettiert und 10 min bei RT inkubiert.

1.14. Elektrophoretische Auftrennung von DNA- und RNA-Fragmenten in Agarosegelen

DNA-Gelelektrophorese: DNA-Fragmente im Bereich von 12-0.1 kb werden in Abhängigkeit von ihrer Länge in verschiedenen konzentrierten Agarosegelen (0.6-2 %) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Agarose wird in 2x TAE-Puffer durch Aufkochen in der

Mikrowelle gelöst, mit 1 Vol. H₂O gemischt und zum Erstarren in eine Gelwanne gegossen. In die Gelwanne wird ein Kamm zum Aussparen der Geltaschen eingehängt. Nach dem Erkalten des Gels wird der Kamm entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer gelegt.

Die DNA-Proben werden mit 1/6 Ladepuffer gemischt, der die Referenzfarbstoffe enthält und das Absacken der DNA in die Taschen gewährleistet, und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wird im Spannungsbereich von 20-110 Volt durchgeführt. Für präparative Gele erfolgte die Elektrophorese mit max. 7 V/cm Gellänge. Zur Abschätzung der Fragmentgrößen wird ein Längenmarker (1kb-Leiter) mit aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wird das Gel für 15 min in eine Schale mit 500 ml Ethidiumbromid-Lösung (1x TAE, 0.5µg/ml ETBr) gelegt. Die DNA-Banden werden auf dem UV-Transilluminator für präparative Gele bei 366 nm sichtbar gemacht und zur Dokumentation mit einer Videokamera-Thermodrucker-Einrichtung fotografiert. Analytische Gele werden mit einem Lumi-Imager (Boehringer Mannheim) dokumentiert.

1.15. Herstellung nicht-radioaktiver Digoxigenin DNA-Sonden

Zur Herstellung einer DIG-markierten Sonde für die Southern-Hybridisierung wurde der DIG-labeling Mix (Boehringer Mannheim) verwendet. Zwischen 50-500 ng aufgereinigtes Fragment in 14 µl TE werden 10 min bei 95°C denaturiert, schnell abzentrifugiert (13000 rpm, 10 sec) und auf Eis abgekühlt. Zu dem Fragment werden 2 µl DLB, 1 µl Zufalls-Hexamere und 2 µl dNTP-Markierungsgemisch pipettiert, gemischt und die Reaktion durch Zugabe von 1 µl Klenow-Enzym (5 U) gestartet. Die Markierungsreaktion erfolgt für 3 h bis ∞ bei 37°C. Nicht eingebaute Nukleotide werden durch eine anschließende Gelfiltration über eine P60 Sepharose-Säule entfernt und die DIG-markierte Sonde mit 400µl 50mM NaCl in TE eluiert.

1.16. Neutraler Kapillartransfer von DNA auf Membranen und Filter (Southern-Blot)

Nach dem Verdau der genomischen DNA, der gelelektrophoretischen Auftrennung und Dokumentation wurde das unter Schütteln zur Denaturierung der DNA für 30 min in Denaturierungslösung behandelt. Das Gel wird nachfolgend unter Schütteln 2 x 15 min in Neutralisierungslösung behandelt. In einem Kapillartransfer wird ∞ die DNA aus dem Gel auf Nitrozellulosefilter (spätere Entwicklung mit NBT/BCIP) übertragen. Dazu werden folgende Lagen unter Vermeidung von Luftblasen stapelförmig übereinander gelegt: zwei Bahnen Whatman-Papier, die mit den Enden in Reservoirs mit 20xSSC als Transferpuffer tauchen; das DNA-Gel; der (die) mit Wasser vorbenetzte Filter (Membran); 1-2 Lagen

Whatman-Papier; 15 cm saugfähige Einmal-Papierhandtücher. Durch den Flüssigkeitssog aus dem Reservoir in den Papierhandtuch-Stapel wird die DNA zum Filter gezogen und haftet an ihm fest. Die DNA wird am folgenden Tag auf dem Trägermaterial fixiert. Dazu werden Nitrozellulosefilter 2 h im Vakuumofen bei 80°C gebacken.

1.17. DNA-DNA-Hybridisierung mit DIG-markierten Sonden

Der Filter mit der DNA wird bei 65°C in einem Schüttelwasserbad mindestens 1 h in 100 ml Prähybridisierungslösung vorhybridisiert, um unspezifische Bindung der Sonde an den Filter zu minimieren. Die Prähybridisierungslösung wird 10-20 x wiederverwendet und bei 4°C gelagert. Der Filter wird anschließend 1 h bei 65°C im Schüttelwasserbad in 100 ml Hybridisierungslösung inkubiert. Die Hybridisierungslösung enthält die Hälfte einer Sonde aus einer DIG-Markierungsreaktion, und wird vor Zugabe des Filters 10 min im Wasserbad aufgeköcht, um die Sonde zu denaturieren, kurz auf Eis abgekühlt und im Schüttelwasserbad auf 65°C temperiert. Die Hybridisierungslösung mit der Sonde wird ca. 10 x wiederverwendet und eingefroren bei -20°C gelagert. Am Morgen nach der Hybridisierung wird der Filter 2 x 15 min in je 100ml vorgewärmter 65°C Waschlösung stringent gewaschen, um ungebundene Sonde zu entfernen, und ist jetzt bereit für die Signaldetektion.

1.18. Signaldetektion nach der DNA-DNA-Hybridisierung

Farbliche Detektion mit NBT/BCIP: Die Signale auf dem hybridisierten Nitrozellulosefilter werden bei RT detektiert, indem der Filter nach den stringenten Waschschritten zunächst 1 min in Puffer-1 äquilibriert wird. Anschließend wird der Filter durch Schwenken in 30 ml Puffer-2 (30 min, RT) geblockt, um später eine unspezifische Bindung des Antikörpers zu verhindern. Puffer-2 wird 10-20x wiederverwendet und bei -20°C gelagert. Der Filter wird nach dem Blocken kurz in Puffer-1 gewaschen und für 30 min in 10 ml Puffer-1 mit 150 mU/ml Alkalische-Phosphatase gekoppeltem anti-DIG-Antikörper (α DIG-AP, Boehringer) inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wird durch 2 x 10 min Waschen mit Puffer-1 entfernt. Zur Farbentwicklung wird der Filter kurz in Puffer-3 umgepuffert und unter Lichtausschluß in die Färbelösung gelegt (20 ml filtrierter Puffer-3, mit 90 μ l NBT-Lsg. und 70 μ l BCIP-Lsg.). Die blau-violetten Signale entwickeln sich innerhalb von 1-15 Stunden. Als Referenz wird ein über Klenow-Fragment End-Markierung mit DIG-dUTP erhaltener DIG-markierter DNA-Marker mitentwickelt.

1.19. PCR

Sowohl für das Klonieren von DNA-Konstrukten, als auch für Analyse und Expression von Transgenen im Mausgenom wurde die PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) eingesetzt. Diese Methode erlaubt die spezifische Amplifikation einer definierten Region eines DNA-Moleküle *in vitro*. Die PCR verläuft in 3 Schritten, die in 20-40 Zyklen immer wieder durchlaufen werden. Im ersten Schritt wird ein nachzuweisendes Stück DNA (Template) durch Erhitzen auf 95°C denaturiert. Durch Abkühlung auf eine Temperatur zwischen 45°C und 70°C wird kurzen (17-80 Nukleotide langen) einzelsträngigen Oligonukleotiden (Primer) die sequenzspezifische Hybridisierung an die Template-DNA ermöglicht (Annealing). Im dritten Schritt erfolgt die Verlängerung der 3'-Enden der angelagerten Primer entlang der Template-DNA mit Hilfe der hitzestabilen Taq-Polymerase (Elongation). Da die Primer so gewählt werden, dass die neu entstandenen DNA-Stränge beider Template-Stränge zueinander teilweise komplementär sind, erhält man durch den zyklischen Ablauf der 3 Schritte eine Verdopplung der DNA-Moleküle pro Zyklus.

Pipettieransatz (50µl): 27,5µl ddH₂O
2µl dNTP (10 mM)
5µl 10x PCR-Puffer
je 5µl 5' bzw. 3'-Primer (je 3-10µM)
0,5µl Taq-Polymerase
5µl Proben DNA-Lösung

1.20. RT-PCR

Zum Nachweis der Expression der Transgene auf mRNA Ebene wurde RT-PCR (Reverse Transkriptase PCR) eingesetzt.

RNA-Isolierung aus Geweben der Maus

Die Organe werden unverzüglich nach dem Tod des Tieres in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur RNA-Isolierung werden ca. 30mg (3mm³) Organ in 600µl RLT/6µl β-Mercaptoethanol für ca. 20-30 Sekunden in einem 2ml Eppendorfgefäß homogenisiert und Gewebereste anschließend abzentrifugiert (13000rpm, 15min, 4°C). Der Gewebekomogenisator wird zwischen verschiedenen Proben mit 0,1M NaOH und ddH₂O gewaschen. 600µl Überstand werden mit gleichem Volumen 70% Ethanol gemischt und auf ein RNA-Schleudersäulchen gegeben. Nach der Zentrifugation (13000rpm, 30Sek.) wird die abzentrifugierte Flüssigkeit verworfen und das Säulchen zuerst mit 700µl RW1 Puffer

(13000rpm, 30 Sek.), dann zweimal mit 500µl RPE-Puffer gewaschen (13000rpm, 1. 30 Sek., 2. 2 min). Das Säulchen wird für 10 Minuten bei RT getrocknet und die RNA nach 2 Minuten Inkubation mit DEPC-H₂O in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß zentrifugiert (13000rpm, 1 min). Die RNA-Menge wird photometrisch bestimmt und die Qualität Gelelektrophorese von 1µg RNA auf einem 1% Agarosegel kontrolliert. Unversehrte RNA zeigt sich in 3 Banden (18S-rRNA der kleinen 40S und 28S- sowie 5/5,8S-rRNA der großen 60S ribosomalen Untereinheit).

Umschreiben von RNA in cDNA

Um DNA zu verdauen werden 3µg RNA in 10µl DEPC-H₂O aufgenommen und mit 40µl DNase-Mix (10µl 10x DNasepuffer, 5µl 10mM DTT, 21µl DEPC-H₂O, 2µl RNA-Out, 2µl RQ1 DNase) für 2 Stunden bei 37⁰C inkubiert. DNase und andere Proteine werden durch Phenol/Chloroform Extraktion entfernt (Zugabe von 50µl Phenol/Chloroform, vortexen, 3 min bei 13000rpm abzentrifugieren). Nach dem Überführen des Überstands in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß wird 50µl Chloroform zugegeben, gevortex und erneut abzentrifugiert (13000rpm, 3 min). Der Überstand wird mit 1µg Glykogen versetzt und die DNA mit 125µl 100% eiskaltem Ethanol für 10 min bei - 80⁰C gefällt. Nach dem Abzentrifugieren (13000 rpm, 15 min, 4⁰C) wird das Pellet mit 125µl eiskaltem 75% Ethanol gewaschen, für 2 Minuten bei RT getrocknet, mit 10µl Primer-Mix aufgenommen (9µl DEPC-H₂O, 1µl 100µM dT₁₅), gevortex, kurz abzentrifugiert und nach einer 10-minütigen Inkubation bei 68⁰C (schmilzt RNA-RNA-Hybride auf) schnell auf Eis gebracht, um eine Rehybridisierung der RNA zu vermeiden. Nach kurzem Zentrifugieren (13000rpm, 20 Sek.) wird 30µl RT-Mix (8µl 5xRT-Puffer, 4µl 100mM DTT, 2µl 10mM dNTPs, 13µl DEPC-H₂O, 1µl RNA-Out, 2µl M-MLV Reverse Transkriptase) zugegeben und die mRNA für 2 Std. bei 37⁰C in DNA revers transkribiert. Umspannen die Primer der nachfolgenden PCR-Reaktion kein Intron, so wird der Primer-Mix in 2 5µl Fraktionen geteilt und nur eine Fraktion mit RT versetzt. Dies erlaubt ein Identifizieren einer DNA-Kontamination der Probe. Nach der reversen Transkription wird der Ansatz mit 60µl MQ-H₂O verdünnt und 5µl in einer RT-PCR eingesetzt. Das erfolgreiche Umschreiben zu cDNA wird durch den Nachweis der cDNA für das Haushalts-Gen HGPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase) kontrolliert.

Rahmen-Programm für PCR und RT-PCR :

	Temperatur	Zeit
1. Schritt (Denaturierung) :	95 ⁰ C	5 min
2. Schritt (Denaturierung) :	95 ⁰ C	30 sek
3. Schritt (Annealing) :	variiert	variiert
4. Schritt (Elongation) :	72 ⁰ C	variiert
5. zurück zu Schritt 2 :	Anzahl der Zyklen variiert	
6. Schritt (Auffüllen) :	72 ⁰ C	10 min
7. Schritt :	4 ⁰ C	unbegrenzt

Verwendete Reaktions-Bedingungen der einzelnen Primer-Paare :

Primerpaar (5' / 3' Primer)	Annealing	Elongation	Zyklen	Produktgröße (bp)
Präparative PCR				
Floxstop5' / Floxstop3'	50 ⁰ C 30 Sek	40 Sek.	35	949
FloxTaginvers 5' / FloxTaginvers 3'	56 ⁰ C 1min	2 min	35	2700
Analytische PCR				
β ₂ m-1 / β ₂ m-2	60 ⁰ C	30 Sek.	34	ca. 300
Tag-1 / Tag-2	60 ⁰ C	30 Sek.	34	474
Floxstop-del-Tag5' / floxstop-del-Tag3'	50 ⁰ C 30 Sek.	40 Sek.	40	unrekombiniert : 1370 rekombiniert : 410
ATI1 s / ATI2s	50 ⁰ C 30 Sek.	2 min	38	unrekombiniert : 1512
ATI1 s / ATI2as	50 ⁰ C 30 Sek.	2 min	38	rekombiniert : 1966
ATI1 s / ATI3s	50 ⁰ C 30 Sek.	2 min	38	unrekombiniert : 1225
ATI1 s / ATI3as	50 ⁰ C 30 Sek.	2 min	38	rekombiniert : 1253
RT-PCR				
HGPRT1/HGPRT2	60 ⁰ C 20 Sek.	40 Sek.	38	ca. 350
SV6/SV9	50 ⁰ C 30 Sek.	1 Min.	40	cDNA : 180 genom. DNA : 500
cre3/cre4	55 ⁰ C Sek.	40 Sek.	38	ca. 400

2. Zellbiologische Arbeitstechniken

2.1. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die einzufrierenden Zellen einer konfluenten Platte werden trypsinisiert, der Trypsin-verdau mit 2 Vol. serumhaltigem Medium abgestoppt und die Zellen abzentrifugiert (3 min, 1500 Upm). Das Zellpellet wird in 400 µl/Kryoröhrchen gekühltes Medium (0°C) resuspendiert und in gekühlte Kryoröhrchen, in die 400 µl gekühltes 2x Einfriermedium (0°C) vorgelegt sind, aliquotiert. Die Kryoröhrchen werden kurz gemischt und zügig auf -70°C weggefroren. Nach einem Tag werden die Zellen zur langfristigen Lagerung von -70°C in einen Tank mit Flüssigstickstoff transferiert.

Zum Auftauen werden die Kryoröhrchen aus dem Flüssigstickstoff entnommen, 2 min bei RT gehalten und unter Schwenken in einem 37°C Ethanolbad zur Vermeidung von Kontaminationen zügig aufgetaut bis nur noch ein kleiner Eiskern vorhanden ist. Die Zellen werden in 5 ml kaltes Medium (0°C) überführt, abzentrifugiert (1500 Upm, 3 min), mit kaltem Medium resuspendiert und erneut abzentrifugiert, um Reste von DMSO zu entfernen. Nach dem Waschschrift werden die Zellen in Medium aufgenommen und auf der gleichen Plattengröße ausplattiert, von der sie weggefroren wurden.

3. Methoden zur Arbeit mit Mäusen

3.1. Isolierung von DNA aus Schwanz und Leber

Die zur Southern-Analyse benötigte genomische DNA wird aus einem 1.5 cm Stück Schwanzspitze von Mäusen gewonnen (Laird *et al.*, 1991). Das Schwanzgewebe wird in 700 µl Gewebepuffer aufgenommen und mit einer Schere zerkleinert. Es werden 10 µl Proteinase K-Lösung (10 mg/ml) zupipettiert, und das Schwanzgewebe üN bei 56°C inkubiert. Am folgenden Tag wird die Probe abzentrifugiert (1500 rpm, 5 min) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 550 µl Isopropanol und mehrmaliges Schwenken wird die genomische DNA als Flocke ausgefällt. Sie wird mit einer zugeschmolzenen Glaskapillare zur Schmelzpunktbestimmung aufgefischt und 10 Sek zuerst in 70 % Ethanol und dann in 100 % Ethanol gewaschen. Die an der Glaskapillare anhaftende DNA wird an der Luft 5 min getrocknet und das Kapillarenende in ein Reaktionsgefäß mit je nach DNA-Menge 100-500 µl TE abgebrochen. Durch Schütteln bei 65°C auf einem Thermoschüttler löst sich die DNA. Für die Southern-Analyse werden 20 µl DNA verdaut.

Wird Schwanz- oder Leber-DNA zur Verwendung in einer PCR-Reaktion gewonnen wird vorgegangen wie eben beschrieben mit folgenden Änderungen, um die Kontaminationsgefahr zu reduzieren : 1. Reinigung der Schere nach jedem genommenen Schwanzende bzw. Leberstücks. 2. Die Waschschrte mit 70% und 100% Ethanol erfolgen für jede Probe in eigenen Eppendorfreaktionsgefäßen.

3.2. Aufbau einer Mikroinjektionsanlage

Ein inverses Stereomikroskop mit einer Vergrößerung von 5x-200x ist mit zwei Mikro-manipulatoren bestückt. Mit ihnen werden Injektions- und Haltenadels bewegt. Die Nadeln sind über mit Paraffinöl gefüllte Schläuche mit einem Paraffinöl-Reservoir verbunden. Über eine Rändelschraube und Kolben an den Enden der Schläuche kann Sog und Druck auf die Nadeln ausgeübt werden. Der Objektisch ist mit einem Einsatz für eine 6 cm Petrischale ausgestattet.

3.3. Herstellung von Injektions- und Haltenadeln

Injektionsnadeln: Die Glaskapillaren werden in einen Mikropipetten-Puller eingespannt und nach Erhitzen ausgezogen. Die Rohlinge werden in der Mikroschmiede an der Spitze gebrochen. Ihr Innendurchmesser beträgt 15 µm. Anschließend werden sie in einem Winkel von 50° geschliffen. Die Spitze der Nadel wird zusätzlich um 30° abgebogen.

Haltenadeln: Die Haltenadeln werden ebenfalls mit einem Mikropipetten-Puller gezogen. Die Nadeln werden bei einem Innendurchmesser von 90-100 µm gebrochen und die Spitze in der Schmiede auf einen Innendurchmesser von 15-20 µm eingeschmolzen.

3.4. Präparation von Zygoten aus trächtigen Mäusen

Damit eine genügend große Anzahl von befruchteten Eizellen zur Verfügung steht, werden die Weibchen aus denen die Zygoten präpariert werden superovuliert. Als Zygotenspender werden 10 (CBA x DBA/2) F1 Weibchen verwendet. Ihnen wird 3 Tage vor der Präparation morgens 5-10 U Gonadotropin in 0,5 ml PBS i.p. zur Eireifung, und 1 Tag vor der Präparation morgens 5-10 U Chorionic-Gonadotropin in 0.5 ml PBS i.p. zum Eisprung gespritzt und die Weibchen anschließend mit (CBA x DBA/2) F1 Männchen verpaart. Am darauf folgenden Tag werden die Weibchen auf einen Vaginalpfropf getestet und positive Weibchen mit CO₂ getötet. Die Mäuse werden geöffnet, und die Eileiter mit einem Stück Uterus entnommen. Dazu wird der Uterus 1 cm vor dem Eileiter mit einer Pinzette gefaßt,

Fettgewebe und Mesometrium abgestreift, und dann der Uterus hinter der Pinzette und der Eileiter direkt am Ovar durchtrennt. Die Eileiter werden in ein Glasblockschälchen mit M2-Medium, dem im ersten Schritt der Präparation Hyaluronidase zugesetzt wird (300 µg/ml), transferiert. Mit zwei spitzen Pinzetten werden die unter der Stereolupe in der Ampulle des Eileiters sichtbaren Zygoten freipräpariert, indem eine Pinzette die Ampulle abklemmt und mit der anderen die Ampulle aufgerissen und ausgestreift wird. Die Eizellen werden mit einer Kapillare, an die ein Schlauch und Mundstück angeschlossen sind, aufgelesen, und 2x in M2-Medium gewaschen. Bis zur Injektion der DNA in den männlichen Vorkern werden sie in eine Tropfenkultur M16-Medium transferiert und bei 37°C inkubiert.

3.5. Mikroinjektion der DNA-Konstrukte

Die linearisierten DNA-Konstrukte werden in einer Konzentration von 2-6 ng/µl in den männlichen Vorkern der Zygote injiziert, wobei dieser sichtbar an Volumen zunimmt.

3.6. Zygotentransfer in scheinschwangere Ammenmäuse

Drei Tage vor der Präparation der Zygoten aus den C57Bl/6 Mäusen werden 20 NMRI Weibchen im Alter von 10-20 Wochen zum Austragen der injizierten Zygoten mit vasektomierten Männchen verpaart. Am folgenden Morgen werden die Weibchen auf einen vorhandenen Vaginalpfropf getestet und positive Weibchen bis zum Transfer der Zygoten gesondert gehalten.

Zum Transfer der Zygoten werden die Ammenmäuse durch i.p.-Injektion von Ketanest/Rompun narkotisiert. Der Rücken wird zwischen Rippenbogen und Beckenkamm beidseitig mit einer Schermaschine rasiert und die Maus auf den Bauch gelegt. Die Haut wird mit einem sagitalen 1 cm Schnitt neben der Wirbelsäule unmittelbar hinter dem Rippenbogen eröffnet. Der Hautschnitt wird über den Fettkörper oberhalb des Uterus geschoben, die Bauchdecke mit einer spitzen Uhrmacher-Pinzette gefaßt und mit einem Schnitt geöffnet. Der am Ovar anliegende Fettkörper wird gesucht, mit einer stumpfen Pinzette gefaßt und zusammen mit Ovar, Ovidukt und Uterushorn aus der Bauchhöhle disloziert. Der Fettkörper wird mit einer Arterienklemme fixiert. Der Uterus wird mit einer feinen Pinzette nahe dem Ovidukt fixiert und mit einer 26g Kanüle unterhalb der Pinzette perforiert. In diese Öffnung wird die Kapillare mit den injizierten Zygoten (ca. 10 Zygoten/Uterushorn in 10-20 µl M16-Medium) eingeführt und die Embryonen mit leichtem Druck über den Schlauch an der Kapillare in das Lumen des Uterus gespült. Die Arterienklemme wird entfernt und der Uterus mit Ovar, Ovidukt und Fettkörper reponiert. Der Hautschnitt wird mit einer Wundklemme

versorgt, und die Mäuse bis zum Aufwachen aus der Narkose in Kleenex-Tücher gewickelt und unter einer Rotlichtlampe vor Unterkühlung geschützt.

4. Gemischte Lymphozytenkultur

In der gemischten Lymphozytenkultur (Mixed Lymphocyte Reaction = MLR) werden T-Zellen gegen Alloantigene *in vitro* stimuliert - in diesem Fall K^b -spezifische Des T-Zellen aus den Milzen von α - K^b Des TZR Tieren ($H-2^{dk}$) (= Effektoren) gegen $H-2^b$ präsentierende professionelle Antigen-präsentierende Zellen (pAPZ) aus den Milzen von C57BL6 Tieren (= Stimulatoren). Milzen beider Gruppen (gleichen Geschlechts) werden steril entnommen, in DPBS aufgenommen, durch Metallsiebe gerieben und abzentrifugiert (1200rpm, 8min, 4°C , Minifuge 2, Heraeus). Dabei wird mind. ein Sieb für 3 Milzen und mind. 1 50ml Falcon-Gefäß pro 4 Milzen verwendet. Der Überstand wird verworfen, die Pellets in speziellem RPMI-Medium aufgenommen (enthält FKS, das nur eine sehr geringe spontane Lyse von Zellen auslöst) und die lebenden Lymphozyten in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt (Anfärbung toter Zellen durch Trypanblau). Die Milzzellen der C57BL6 Mäuse werden durch radioaktive Bestrahlung (3000 Rad bzw. 30 Gray) an der Proliferation gehindert. Effektoren und bestrahlte Stimulatoren werden auf eine Zelldichte von 2×10^6 Zellen /ml eingestellt, in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und je 40ml in 75cm^2 Zellkulturflaschen überführt. Nach 5 Tagen bei 37°C , 80% Luftfeuchtigkeit und 7-8% CO_2 -Konzentration werden die Zellen in 50ml Falcon-Gefäße überführt, abzentrifugiert (1200rpm, 8min, 4°C , Minifuge 2, Heraeus), in DPBS aufgenommen und erneut in der Anwesenheit von Trypanblau ausgezählt. Je 10^7 aktivierte T-Zellen werden in 500 μl DPBS in eine Schwanzvene der Versuchstiere (vorher mit Rotlicht erwärmt) injiziert.

5. Zytotoxizitätstest

Die erfolgreiche Stimulation der Effektoren der gemischten Lymphozytenkultur kann durch diesen Test (Brunner, 1968) *in vitro* kontrolliert werden. Hierzu werden Zellen, die das entsprechende Antigen präsentieren, gegen das die T-Zellen stimuliert worden sind, mit radioaktivem $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ markiert, das bei Lyse durch aktivierte T-Zellen in den Überstand freigesetzt wird. Wiederaufnahme des ^{51}Cr von nichtlysierten Zellen ist nicht möglich, da die Zielzellen nur die hexavalente und nicht die trivalente Form des ^{51}Cr aufnehmen können, das aber nach der Aufnahme intrazellulär gebildet wird. Die Menge an Radioaktivität (γ -Strahlung) im Überstand entspricht der zytotoxischen Aktivität.

Je 10^6 Zellen der Zielzellen (1T und 1T-K^b) werden in 1ml RPMI-Medium aufgenommen, mit 1ml FKS gemischt, kurz abzentrifugiert und der Überstand bis auf ca. 200-300µl abgegossen. 100µCi ^{51}Cr pro Zielzelllinie werden zugegeben (ca. 100-200µl da $t_{1/2} = 28\text{d}$) und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wird 4 mal mit 2ml RPMI-Medium die nicht aufgenommene Radioaktivität gewaschen, die Zellen nach Aufnahme in 1ml RPMI-Medium in einer 1:2 Verdünnung mit Trypanblau ausgezählt und auf eine Konzentration von 3×10^3 Zellen/100µl eingestellt.

Während der ^{51}Cr -Markierung der Zielzellen werden die Effektoren für den Test vorbereitet. Pro Zielzelllinie werden 3 Vertiefungen (Triplikate) auf einer 96-well Platte mit je 6×10^5 Effektor-Zellen aus der MLR in 200µl beladen. Aus diesen Vertiefungen werden 100µl in die nächste Reihe übertragen, in die schon jeweils 100µl RPMI-Medium vorgelegt sind. Dieser Schritt wird noch 4 mal wiederholt. 100µl aus der 6. Reihe werden verworfen. Die 7. Reihe erhält nur 100µl RPMI-Medium (Messung der spontanen Lyse) und die 8. Reihe 100µl 10% SDS (maximale Lyse).

Nun werden zu jeder Vertiefung 100µl der Zielzellen gegeben (entspricht 3×10^3 Zellen) und gemischt. In der ersten Reihe beträgt somit das Verhältnis von Effektorzellzahl zu Zielzellzahl (E:Z) 100:1 und nimmt mit jeder Reihe um den Faktor 2 bis 3:1 ab. Der Ansatz wird für 4h bei 37°C inkubiert, anschließend abzentrifugiert (1 min bei 2000 rpm) und pro well 100µl Überstand in kleine Plastikröhrchen überführt, diese mit flüssigem Wachs versiegelt und die Stärke der radioaktiven Strahlung an einem γ -Counter (Cobra Auto-Gamma, Packard, Dreieich) gemessen. Von allen Meßwerten wird die durchschnittliche spontane Lyse abgezogen und prozentual zur maximalen Lyse berechnet. Die Mittelwerte der Triplikate werden als „Prozent spezifische Lyse“ graphisch dargestellt.

6. Herstellung anionischer Liposomen

Mit Hilfe anionischer Liposomen soll ein DNA-Konstrukt in die Leber der Versuchstiere transportiert werden. Das Protokoll zur Herstellung dieser Vektoren wurde von der Gruppe um Salvatore Alino in Barcelona entwickelt und ist bis auf wenige eigene Modifikationen in Biochemical Pharmacology (Crespo *et al.*, 1996) publiziert. Die Herstellung der Liposomen beruht auf dem Prinzip der aufeinanderfolgenden De- und Rehydratisierung eines Lipid-DNA-Gemisches.

Folgende ethergelöste Lipide werden in einem 15ml Correx-Glasröhrchen gemischt :

5µmol Cholesterol (CH) + 4µmol Phosphatidylcholin (PC) + 1µmol Phosphatidylserin (PS) Der Ether wird für ca. 1 Stunde in einem Rotationsverdampfer evaporiert (ca. 40°C Wasserbad) und die dünne Lipidschicht mittels Ultraschall in 1ml destilliertem Wasser suspendiert. Große Lipidaggregate und Titanpartikel werden abzentrifugiert (20min, 13500rpm, Sorvall RC5C Plus mit SS34 Rotor) und der Suspension 40µg ungeschnittenem Plasmid (pUC19-Alb-cre) in 40µl TE zugegeben. Das Gemisch wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren und über Nacht lyophilisiert (-50°C, 0,01mbar). Rehydratisierung erfolgt mit 40µl ultrareinem Wasser unter gelegentlichem leichtem Vortexen innerhalb von 1 Stunde. Nach dem langsamen Auffüllen mit 10mM Hepes auf 600µl werden 100 – 300 µl intravenös in die Schwanzvene von Mäusen, die loxP-Stellen in ihrem Genom tragen, injiziert.

7. Nachweis von ALT-Aktivität im Mausplasma

Als Nachweis einer Leberschädigung wurde der Anstieg der Konzentration des leberspezifischen Enzyms Alanin-Aminotransferase (ALT oder ALAT, auch GPT für Glutamat-Pyruvat-Aminotransferase) im Blut verwendet. Die Blutabnahme erfolgte nach Ganzkörperbestrahlung mit Rotlicht für 5 bis 10 Minuten an einer der Schwanzvenen. Ca. 200-300µl Blut wurden in 100µl PBS/Heparin (5u) aufgenommen und das verdünnte Plasma durch zweimalige Zentrifugation (1. 5500rpm für 5 Min, 2. 8000rpm für 5 Min, Biofuge Pico Heraeus) von der Zellfraktion abgetrennt. 100µl des verdünnten Heparin-Plasmas wurden zu 500µl Reagenzlösung (MPR1, Boehringer Mannheim) gegeben. Die Reagenzlösung enthält L-Alanin, α-Ketoglutarat, Laktat-Dehydrogenase (LDH) und NADH. Ist ALT im Plasma vorhanden wird die Umsetzung von L-Alanin und α-Ketoglutarat zu L-Glutamin und Pyruvat katalysiert. Letzteres wird durch die LDH unter Oxidation von NADH zu L-Laktat reduziert. Der Verbrauch von NADH der Reagenzlösung wird photometrisch (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech) durch die Abnahme der Extinktion bei 340nm detektiert und korreliert mit der ALT-Aktivität im Plasma.

Berechnung der ALT-Aktivität aus der Extinktionsabnahme :

$$\text{ALT-Aktivität (u/l)} = \Delta E_{340\text{nm}}/\text{min} \bullet 926 \bullet \text{TF} \bullet \text{VF}$$

TF (Temperaturumrechnungsfaktor : von 25°C auf 37°C) : 1,85

VF (Verdünnungsfaktor) : $VF = (x [\mu l] + 100\mu l) / x [\mu l]$

$$x [\mu l] = (\text{Gesamt volumen } [\mu l] - 100 [\mu l]) / 2$$

8. Histologische Methoden

8.1. Einfrieren von Organen für Kryoschnitte

Ein Schockgefrieren von entnommenen Organen der Maus in flüssigem Stickstoff führt oft zum Zerplatzen der Organe. Daher werden die Organe zur Anfertigung von Kryoschnitten mit Hilfe von Isopentan eingefroren, was ein Zerspringen weitestgehend verhindert und später morphologisch bessere Schnitte liefert. Ein Becherglas mittlerer Größe wird in ein Stropor-gefäß mit Flüssigstickstoff gestellt und durch ein flaches Metallgewicht am Boden gehalten. Ein kleines Becherglas wird mit 20 ml Isopentan gefüllt, das Isopentan in Flüssigstickstoff auf -30 bis -50°C abgekühlt und auf Eis gestellt. Die Organe der Maus werden entnommen und im Isopentan eingefroren (2-5 min). Anschließend wird das kleine Becherglas mit den Organen in das große Becherglas gestellt, und weiter abgekühlt (5-10 min). Bevor das Isopentan zu frieren beginnt werden alle Organe entnommen und direkt in flüssigen Stickstoff transferiert. Die Lagerung der Organe erfolgt bei -80°C. Weiche Organe wie Pankreas, Thymus und Lymphknoten werden nicht direkt in Isopentan weggefroren, sondern in kleinen Plastikschälchen in 200-500µl OTC eingerührt und dann eingefroren. Die Plastikschalen werden nach dem Einfrieren kurz angetaut, so daß die OTC-Blöcke entnommen und ohne Schale bei -80°C gelagert werden können.

8.2. Immunhistologische Phosphatase-Färbung an Kryoschnitten

Von den eingefrorenen Organen werden Kryoschnitte (5-15µm Dicke) auf Objektträger aufgebracht. Die Schnitte werden 30 min bei RT luftgetrocknet, 10 min in Aceton fixiert, und erneut 10 min luftgetrocknet. Die Schnitte können sofort gefärbt, oder für einige Monate bei -20°C gelagert werden.

Eingefrorene Schnitte läßt man 5 min auftauen, refixiert 5 min in Aceton und lufttrocknet den Schnitt 10 min bei RT. Die Färbung erfolgt sofern nicht anders angegeben bei RT in einer Feuchtkammer. Mit einem Fettstift wird ein Ring um die Schnitte gezogen, und der Primärantikörper (unverdünnter Hybridomüberstand) auf den Schnitt gegeben. Nach der Inkubation (1 h RT) wird ungebundener Antikörper durch Waschen mit TBS (3 x 3 min in

Standküvette) entfernt. Der Schnitt wird dann 30 min mit Zweitantikörper (Kaninchen-anti-Ratte-IgG, 1:500 in TBS) inkubiert (Verdünnung 1:200 in TBS) und anschließend erneut gewaschen. Der Drittantikörper (Ziege-anti-Kaninchen-APAAP; 1:300 in TBS) bleibt ebenfalls mind. 30 min auf den Schnitten. Nach einem letzten Waschen werden die Schnitte in TBS, dann Entwicklungspuffer transferiert und mit der Farblösung inkubiert, die folgendermassen hergestellt wird : 88,5 ml Entwicklungspuffer wird mit 90µl Levamisol gemischt und zu 480µl NaNitrit/189µl Neufuchsin gegeben und durch Schwenken in einem Erlenmeyer Kolben gut gemischt. Hierzu wird 48mg Naphtol, das in 564µl DMF gelöst wurde hinzugefügt. Die Färbereaktion dauert zwischen 2 und 10 Minuten und wird durch Transfer der Schnitte in Wasser gestoppt. Eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 3 Sek. hebt die Gewebestrukturen hervor. Die Schnitte werden mit Kayser's Glyzerolgelatine betropft und eingedeckelt.

8.3. Herstellung von Paraffin-Schnitten und anschließender HE-Färbung

Alle Paraffinschnitte mit nachfolgender HE-Färbung wurden in der Anbteilung von Prof. Gröne im DKFZ angefertigt.

Direkt nach der Organentnahm wurden die Organe mit 4% Formalin in PBS fixiert und falls nicht zu vermeiden bei 4°C gelagert. Nach dem Einbetten in Paraffin wurden 5µm-dicke Schnitte angefertigt für 2 mal 10 Minuten mit Xylol entparaffinisiert und mit einer absteigenden Ethanolreihe (je 2 Minuten : 2x100%, 2x96%, 1x80% 1x70%, 1xVE-H₂O) entwässert.

HE bedeutet eine Doppelfärbung mit Hämalaun (H) und Eosin (E). Hämalaun ist ein positiv geladener Farbstoff, der allgemein negativ geladene Strukturen (Nuklei) blau anfärbt. Eosin führt zu einer rötlichen Gegenfärbung des Plasmas und Bindegewebes.

Die Schnitte werden 5 min in Hämalaun inkubiert, anschließend für 5 min mit Leitungswasser gebläut um dann für 15 min mit Anilinblau-Eosin angefärbt zu werden. Nach zweimaligem Spülen mit ddH₂O (je 30 Sek.) wird mit 96% Ethanol differenziert (bis zu 30 Sek.) und mit 100% Ethanol (20 Sek.) entwässert. Die Schnitte werden 2 mal mit Xylol gewaschen und mit Entelan eingedeckelt.

9. Durchflußzytometrie

Zum Nachweis der Expression von Oberflächenmolekülen wurden die zu testenden Zellen geerntet und in Waschmedium (1xPBS mit 2% FKS und 0,1% Na-Azid) aufgenommen und gewaschen. Anschließend wurden sie 20 Minuten mit 50µl des monoklonalen

Antikörperüberstands oder entsprechenden Verdünnungen von aufgereinigten Antikörpern bei 4⁰C im Dunkeln inkubiert. Wurde ein biotinylierter Ertsantikörper verwendet erfolgte nach einem zweimaligen Waschen die Inkubation mit einem Sekundärreagenz (Strepatavidin-Red670 bzw. –PE) für 10 Minuten bei 4⁰C. Nach erneutem zweimaligem Waschen wuden die Zellen in 100µl Waschmedium aufgenommen und an einem FACScan Durchflußzytometer (Becton-Dickinson, Heidelberg) gemessen. Die Daten wurden anschließend mit Hilfe der Software Cell-Quest analysiert.

IV. Ergebnisse

A. Entzündung und Autoimmunität

1. Induktion von Autoaggression gegen Lebergewebe in unserem Tiermodell

Um der Frage nachzugehen, unter welchen Bedingungen tolerante T-Zellen körpereigenes Gewebe angreifen, wurde folgendes System gewählt. Mäuse, die unter der Kontrolle des Albumin-Promotors das MHC-Klasse I Molekül H-2K^b auf Hepatozyten (Schönrich *et al.*, 1992) und außerdem den K^b spezifischen TZR (DesTZR) auf einem großen Teil der T-Zellen exprimieren (Schönrich *et al.*, 1991), zeigen eine funktionelle Tolerisierung der transgenen T-Zellen. Dies zeigt sich sowohl im Ausbleiben einer spontanen Autoimmunerkrankung als auch im subkutanen Wachstum des Transplantationstumors P815, der mit dem K^b-Gen transfiziert ist (P815.K^b). Obwohl die K^b-spezifischen T-Zellen sich *in vivo*, durch Injektion von P815.K^b-Zellen, die zusätzlich IL-2 sezernieren, aktivieren lassen, führt dies weder zu einer Autoaggression gegenüber Lebergewebe noch zu einer Infiltration in Leberparenchym. Erst wenn nach der T-Zell-Aktivierung zusätzlich noch eine Entzündung in der Leber gesetzt wird (durch eine Infektion mit dem Bakterium *Listeria monocytogenes*, das nach i.v. Injektion vornehmlich Milz und Leber befällt (Harty *et al.*, 1996), infiltrieren und attackieren die aktivierten T-Zellen Leberwebe, was sich durch eine erhöhte Aktivität des leberspezifischen Enzyms Alanin-Aminotransferase (ALT) im Plasma der Tiere nachweisen lässt (Limmer *et al.*, 1998; Abb. 1). Die Listerien-induzierte Infiltration korreliert mit einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen, wie ICAM-1 und VCAM-1 auf sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC) und der Hochregulation von MHC Klasse II, das vermutlich über IFN- γ induziert wird.

Ob es sich bei dem beschriebenen Leberschaden ausschließlich um eine Autoaggression handelt, oder ob der transgene DesTZR nicht mit einem von Listerien-abstammenden Peptid kreuzreagiert, ein Vorgang der als molekulare Mimikry bekannt ist, kann mit diesem Versuchsansatz nicht beantwortet werden. Aus diesem Grund sollte eine Entzündung in der Leber nicht durch eine Infektion mit einem komplexen Erreger sondern durch ein Reagenz induziert werden, das die Präsentation eines körperfremden Peptids auf K^b ausschließt. Zu diesem Zweck sollten sogenannte CpG-Oligodeoxynukleotide (CpG-ODN), in das System eingeführt werden

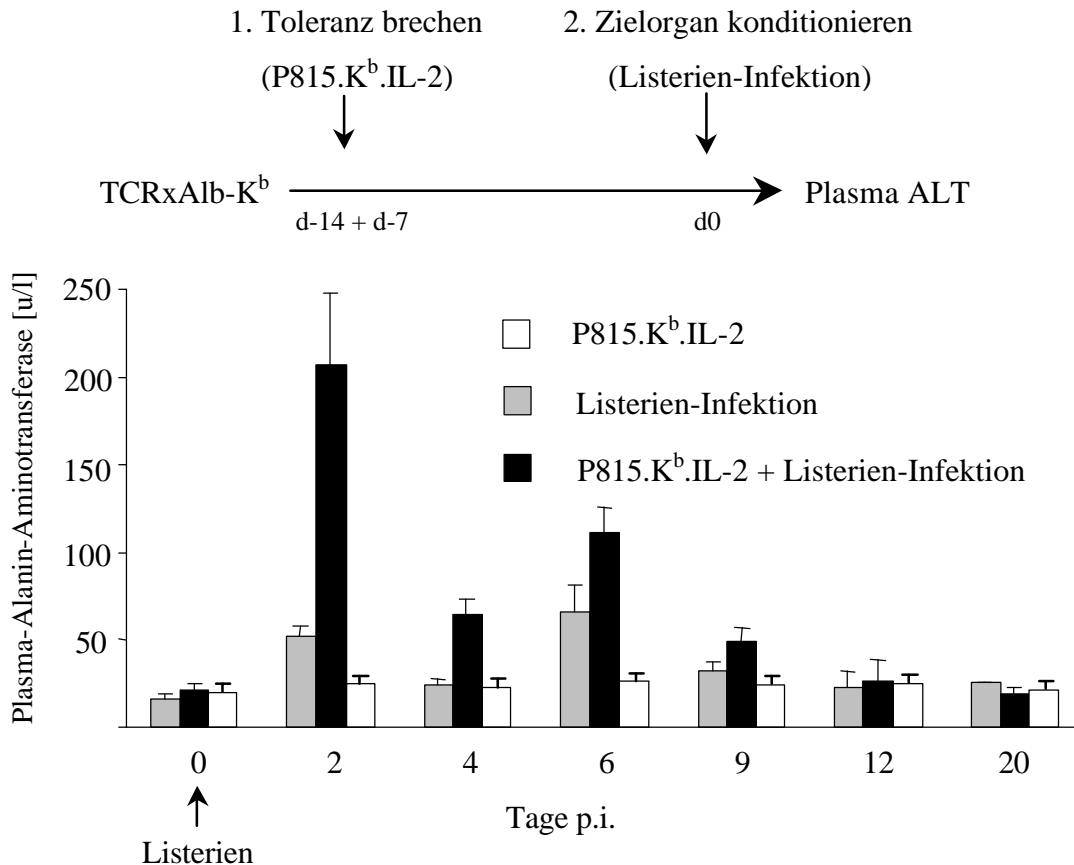


Abb. 3 : Zwei Schritte sind notwendig, um transienten autoimmunen Leberschaden zu induzieren. TCRxAlb-K^b Tiere (schwarze Balken) wurden zweimal mit P815.K^b.IL-2 injiziert (d-14 mit 5×10^6 Zellen s.c. und d-7 mit 5×10^6 je häftig s.c. und i.p.) und an Tag 0 mit Listerien (10^4 CFU) i.v. infiziert. Innerhalb der folgenden 20 Tage wurde den Tieren an den angegebenen Tagen Blut entnommen und die Aktivität von ALT im Plasma bestimmt. Als Kontrollen dienten Tiere, die entweder nur mit P815.K^b.IL2 (weiße Balken) oder Listerien (graue Balken) behandelt wurden. Abkürzungen : p.i. = post infectionem.

2. Transfer aktivierter T-Zellen in ODN-behandelte CRP-K^b

CpG-ODN sind einzelsträngige DNA-Sequenzen, die ein *unmethyliertes* CpG-Dinukleotid in einer konservierten Hexanukleotid-Struktur enthalten (Wagner, 2000; Raz, 2000). CpG-ODN aktivieren Dendritische Zellen und Makrophagen direkt, vermutlich über einen noch unbekannten Rezeptor, zur Hochregulation von MHC- (Klasse I und II) und kostimulatorischen (B7.1, B7-2, CD40) Molekülen und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen (wie z.B. IL-12, TNF- α , IFN- $\alpha/\beta/\gamma$, IL-1, IL-6, u.a.). Bei intraperitonealer Applikation kommt es unter anderem zu systemischen Entzündungsreaktionen, die von Infiltrationen von Immunzellen in verschiedene Gewebe wie Niere, Leber, Pankreas, Lungen und Lymphknoten in unterschiedlichem Ausmaß begleitet werden (Branda *et al.*, 1993; McIntyre *et al.*, 1993; Zhao *et al.*, 1996). Da 80% aller sessilen Makrophagen in der Leber resident sind (Cope *et al.*, 1990), das entspricht 15% aller Zellen in der Leber, und diese durch

CpG-ODN stark stimuliert werden, ist eine präferenzielle Inflammation in diesem Organ zu erwarten.

Folgende Oligodeoxynukleotide wurden im Verlauf der Arbeit verwendet. Das CpG-ODN 1826 (Yi *et al.* 1996; Weiner *et al.*, 1997) ist ein 20-mer und enthält zwei Hexanukleotid-Kassetten mit je einem CpG-Dinukleotid. Diese Sequenz führt in Milzzellkulturen zur Freisetzung großer Mengen IL-6, IL-12, IFN- γ und TNF- α in den Überstand (Walker *et al.*, 1999). Das ODN 1668 (Krieg *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 1996) enthält nur ein CpG-Dinukleotid und ist weniger potent in der Induktion von proinflammatorischen Zytokinen im Vergleich zu ODN 1826. Die Nukleotidsequenz von ODN 1720 (Cowdery *et al.*, 1996) ist bis auf das invertierte CpG-Dinukleotid identisch mit ODN 1668, besitzt jedoch keine immunstimulatorischen Eigenschaften mehr. Es dient in verschiedenen Experimenten als Negativkontrolle.

ODN 1826 : TCCAT GACCGTT CCT GACCGTT

ODN 1668 : TCCAT GACCGTT CCT GATCCT

ODN 1720 : TCCAT GAGCTT CCT GATCCT

Abb. 4 : In der Arbeit verwendete Oligodeoxynukleotide (ODN).

Die verwendeten ODN enthalten entweder zwei (1826), eine (1668) oder keine (1729) immunstimulatorische CpG-Dinukleotide in Hexanukleotid-Sequenz. Alle 3 Oligodeoxynukleotide sind durch Phosphorothioat-Modifikation signifikant Nuklease-resistenter und weisen dadurch *in vivo* deutlich höhere Halbwertszeiten auf.

Um festzustellen, ob CpG-ODN-Injektion in unserem System eine Listerieninfektion ersetzt, und aktivierten Des-T-Zellen ermöglicht Lebergewebe anzugreifen, wurde folgendes Experiment durchgeführt. Mäuse, die das K^b-Molekül unter der Kontrolle des C-reaktiven-Protein(CRP)-Promotors ausschließlich auf Hepatozyten exprimieren (CRP-K^b, Ferber *et al.*, 1994) werden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit 40 μ g CpG-ODN 1826 i.p. injiziert (siehe Abb. 4). Am zweiten Tag werden gleichzeitig mit der ODN-Behandlung 10⁷ T-Zellen aus Milzen von DesTZR-transgenen Tieren i.v. transferiert (adoptiver Transfer = AT), die 5 Tage lang gegen bestrahlte C57BL6-Milzzellen in einer Gemischten-Lymphozyten-Kultur stimuliert wurden. Die K^b-spezifische Zytotoxizität der transferierten T-Zellen wurde in einem ⁵¹Cr-Freisetzungstest kontrolliert (Abb. 5) und lag bei den verschiedenen Experimenten zwischen 45% und 65% spezifischer Lyse bei einem Effektor-zu-Zielzellen-Verhältnis von 100:1. Der adoptive Transfer wurde als Model gewählt, um die Phase der Aktivierung der T-Zellen und die Phase der Entzündungsreaktion unterscheiden zu können.

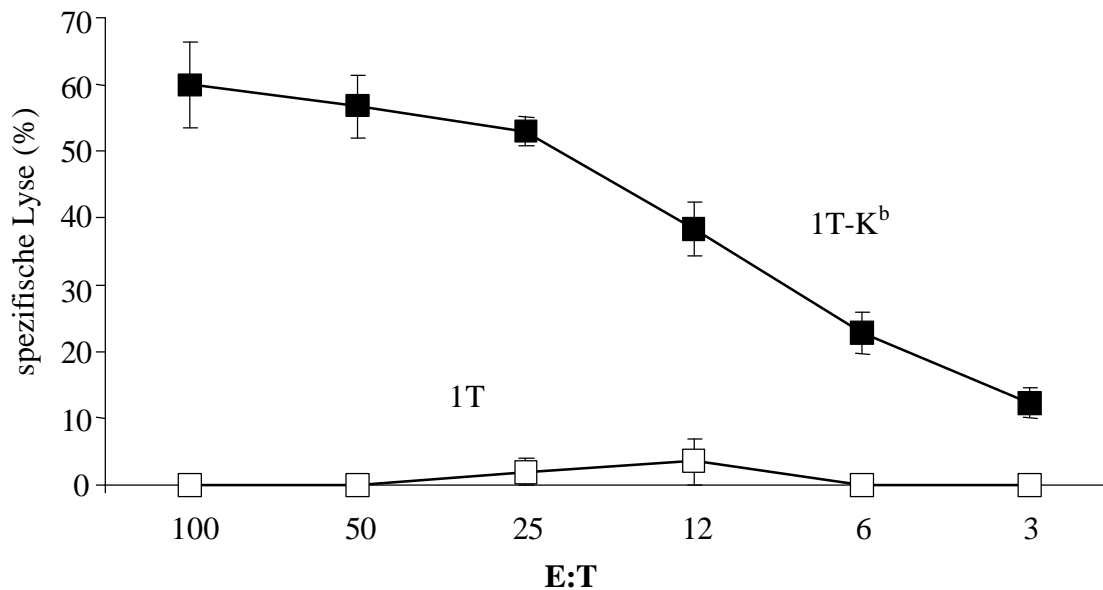


Abb. 5 : Nachweis K^b-spezifischer Zytotoxizität transferierter T-Zellen.

Milzzellen von DesTZR-transgenen Tieren wurden in einer gemischten Lymphozytenkultur mit bestrahlten B6-Milzzellen für 5 Tage kokultiviert und anschließend in einem 4 stündigen Zytotoxizitätstest auf ihre Fähigkeit hin Zielzellen K^b-spezifisch zu lysieren untersucht. Als Zielzellen wurden die Zelllinie 1T und die Transfektante 1T-K^b verwendet. Die Standardabweichungen sind als senkrechte Balken angegeben. Abkürzungen : E:T = Verhältnis von Effektorzellen zu Zielzellen.

Um zwei Tage nach adoptivem Transfer Leberschaden zu messen, wurde den Tieren aus einer Schwanzvene Blut entnommen und das Plasma auf die Aktivität des Enzyms Alanin-Aminotransferase (ALT) hin untersucht, das bei Leberschaden ins Plasma freigesetzt wird. Im Folgenden werden die Ergebnisse aus zwei unabhängigen umfangreichen Experimenten in zwei separaten Abbildungen (Abb. 6 und 7) präsentiert, um verschiedene Fragestellungen deutlich zu machen.

Abbildung 6 zeigt, daß CRP-K^b transgene Tiere, die mit ODN 1826 behandelt und mit aktivierten DesT-Zellen adoptiv transferiert wurden, einen deutlich erhöhten ALT-Wert ($x = 198$ U/l) an Tag 2 nach Transfer aufweisen. Der Leberschaden in CRP-K^b Tieren, die nur ODN 1826 erhalten haben, liegt mit 83 U/l signifikant niedriger, allerdings erkennbar höher als die ALT-Aktivität im Plasma unbehandelter Tiere ($x = 31$ U/l). Das zeigt, daß zwar ein Teil des Leberschadens unspezifisch durch die Behandlung mit CpG-ODN induziert wird, der Großteil des Leberschadens jedoch durch die transferierten aktivierten T-Zellen verursacht ist.

Der adoptive Transfer aktivierter T-Zellen führt in Abwesenheit einer Entzündungsreaktion zu keinem Leberschaden. Dies wird gezeigt durch CRP-K^b Tiere, die vor dem Transfer nicht mit dem immunstimulatorischen CpG-ODN 1826, sondern mit dem CpG-freien ODN 1720 behandelt wurden. CRP-K^b Tiere, die mit ODN 1720 (Bendigs *et al.*, 1999) vor Transfer behandelt wurden, weisen an Tag 2 nach Transfer nur eine moderate Erhöhung des ALT-Wertes auf 56 U/l auf.

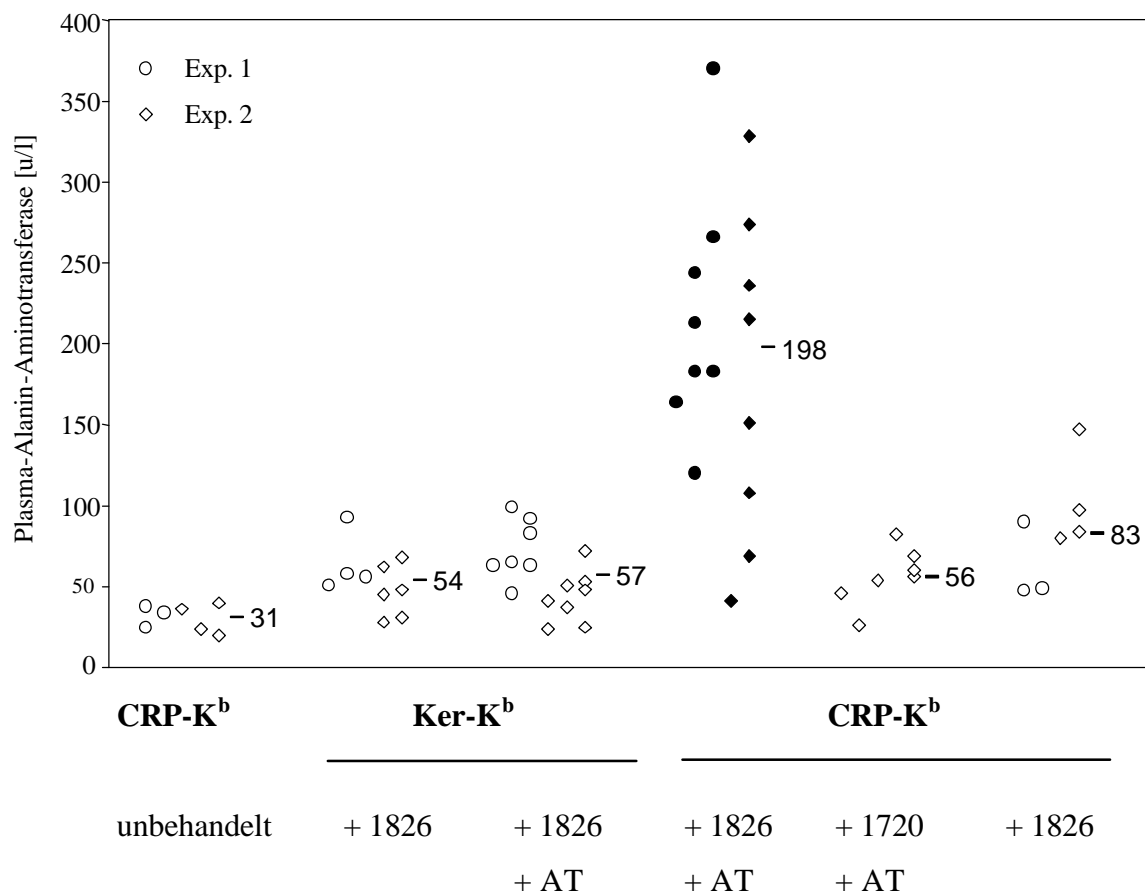


Abb. 6 : CpG-ODN-Behandlung erlaubt aktivierten T-Zellen Lebergewebe zu schädigen.

Aktivierte K^b-spezifische Milzzellen von DesTZR-transgenen Tieren wurden in CRP-K^b bzw. Ker-K^b Mäuse transferiert, die einen Tag vorher und zeitgleich mit dem Transfer i.p. mit jeweils 40µg CpG-ODN 1826 bzw. 1720 behandelt wurden. 2 Tage nach Transfer wurde die Aktivität der Alanin-Aminotransferase im Plasma der Tiere bestimmt. Als weitere Kontrollen dienten Ker-K^b und CRP-K^b, die nur 40µg CpG-ODN 1826 erhielten. Unbehandelte CRP-K^b Tiere geben das Grundniveau der Aktivität von ALT im Plasma der Versuchstiere an. Dargestellt sind die Ergebnisse von 2 unabhängigen Experimenten (Kreise und Romben). Die Mittelwerte der Meßwerte jeder Gruppe aus beiden Experimenten sind als waagerechte Striche angegeben. Abkürzungen : AT = adoptiver Transfer (i.v.) von 10⁷ akt. Milzzellen aus DesTZR-Tieren; 1826 = CpG-ODN 1826, 1720 = CpG freies ODN.

Die Autoaggression ist antigen-spezifisch, da Kontrolltiere, die das K^b-Molekül statt auf Hepatozyten auf Keratinozyten der Haut exprimieren (2,4-KerIV-K^b, Schönrich *et al.*, 1992) nur einen sehr milden Leberschaden aufweisen (\bar{x} = 57 U/l) nachdem sie mit ODN 1826 und adoptivem Transfer aktivierter T-Zellen behandelt wurden. Dieser leichte Leberschaden beruht ausschließlich auf dem K^b-unspezifischen Effekt des ODN 1826 auf die Leber, was im Vergleich zu Ker-K^b Tieren, die ausschließlich mit ODN 1826 behandelt wurden, deutlich wird (54 U/l).

Dieses Experiment zeigt, daß die Induktion einer Entzündung im Zielorgan in diesem System ausreicht, um präaktivierten selbstreaktiven T-Zellen Autoaggression zu ermöglichen.

3. Neutralisation von CpG-ODN induziertem IL-12 *in vivo* führt zu 75% verringertem Leberschaden.

Die inflammatorische Wirkung CpG-haltiger ODNs beruht in erster Linie auf der Aktivierung von Dendritischen Zellen und Makrophagen zur Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen. Unter ihnen spielt IL-12 eine entscheidende Rolle, da es NK- und T-Zellen zur Proliferation, zytolytischen Aktivität und vor allem zur IFN- γ Sekretion anregt (Trinchieri *et al.*, 1994). Außerdem führt IL-12 zur Entstehung von Th1-Zellen *in vitro* (Manetti *et al.*, 1993; Hsieh *et al.*, 1993) und *in vivo* (Afonso *et al.*, 1994). IL-12 Applikation führt in mehreren Tiermodellen zur Induktion, Beschleunigung oder Verstärkung von Autoimmunreaktionen, wie z.B. bei Diabetes mellitus (Mosman *et al.*, 1989a+b), Experimenteller Autoimmuner Enzephalomyelitis (Abelsira-Amar *et al.*, 1992) und Kollagen-induzierter Arthritis (van Reijssen *et al.*, 1992).

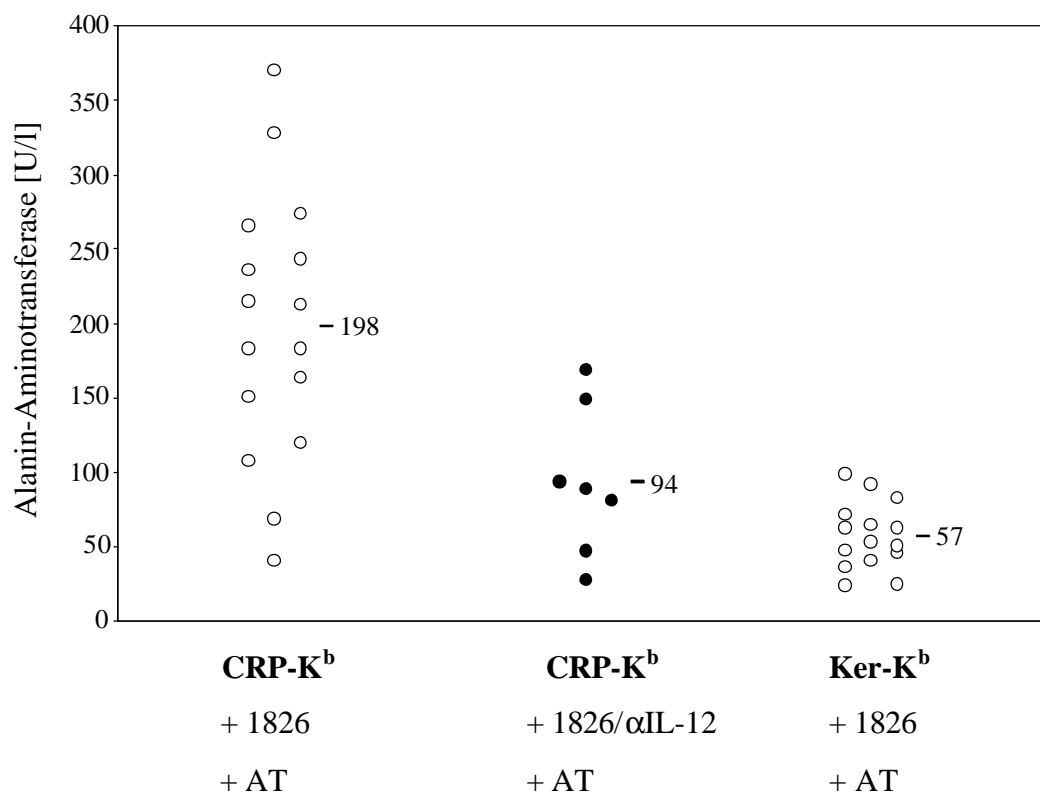


Abb. 7 : IL-12 neutralisierende Antikörper verringern autoimmunen Leberschaden.

Aktiviert K^b-spezifische Milzzellen von DesTZR-transgenen Tieren wurden in CRP-K^b bzw. Ker-K^b Mäuse transferiert, die einen Tag vorher und zeitgleich mit dem Transfer i.p. mit jeweils 40µg CpG-ODN 1826 bzw. zusätzlich mit 500µg αIL-12 (250µg C17.8, 250µg C15.6) behandelt wurden. 2 Tage nach Transfer wurde die Aktivität der Alanin-Aminotransferase im Plasma der Tiere bestimmt. Die Mittelwerte der Meßwerte jeder Gruppe sind als waagerechte Striche angegeben. Abkürzungen : AT = adoptiver Transfer (i.v.) von 10⁷ akt. Milzzellen aus DesTZR-Tieren; 1826 = CpG-ODN 1826.

Um die Rolle von IL-12 bei der durch ODN 1826 vermittelten Sensibilisierung des Lebergewebes für aktivierte T-Zellen zu untersuchen, wurden CRP-K^b Tiere einen Tag vor

und während des adoptiven Transfers von 10^7 aktivierten DesT-Zellen gleichzeitig mit 40µg ODN 1826 und α -IL-12 i.p. injiziert. Um IL-12 möglichst effizient zu neutralisieren wurde ein Gemisch aus 2 verschiedenen Antikörpern (je 0,5mg pro Injektion) eingesetzt, die verschiedene Epitope des IL-12 Heterodimers erkennen (C17.8 und C15.6).

Abb. 7 zeigt, daß Applikation von ODN 1826 zusammen mit Antikörpern gegen IL-12 den autoimmunen Schaden von 198 auf 94 U/l senkt. Da der K^b -unabhängige Leberschaden in Ker- K^b bei 57 U/l liegt, beträgt die Reduktion des autoimmunen Schadens von 141 U/l ($198 - 57$ U/l) auf 37 U/l ($94 - 57$ U/l) ca. 75 %. Der verbleibende Schaden von 25 % beruht vermutlich auf nicht vollständig neutralisiertem IL-12 oder auf anderen ODN induzierten Zytokinen wie z.B. TNF- α oder IFN- γ .

Somit spielt IL-12 eine entscheidende Rolle beim ODN vermittelten Effekt, der es aktivierten T-Zellen erlaubt Lebergewebe antigenspezifisch zu attackieren.

4. Der autoimmune Leberschaden ist transient, kann jedoch durch weitere ODN-Injektionen reinduziert oder prolongiert werden.

Alb- K^b x DesTZR Tiere, deren Des $^+$ T-Zellen durch eine Injektion von P815. K^b .IL-2 aktiviert und deren Leber durch eine Listerieninfektion konditioniert wurden, wiesen nur eine transiente Autoimmunreaktion an Tag 2 auf. Schon an Tag 5 nach Listerieninfektion war die Autoaggression deutlich zurückgegangen. Ob die ODN-vermittelte Autoimmunität in diesem Transfersystem der gleichen Kinetik folgt, sollte im folgenden Experiment festgestellt werden.

10^7 *in vitro* aktivierte Des T-Zellen wurden in ODN-behandelte CRP- K^b , Alb- K^b und Ker- K^b Tiere i.v. injiziert und der Leberschaden (ALT-Wert) an Tag 2, 5 und 12 bestimmt. Für diesen Versuch wurde das ODN 1668 verwendet, das nur ein CpG-Dinukleotid enthält, sonst jedoch nahezu identische Sequenz aufweist, wie das ODN 1826. ODN 1668 (Bendigs *et al.*, 1999) induziert *in vitro* geringere Zytokinmengen als ODN 1826 (Walker *et al.*, 1999). Um den Vergleich mit dem Listerienexperiment zu erleichtern wurden neben den CRP- K^b außerdem Alb- K^b Tiere eingesetzt, die K^b ebenfalls leberspezifisch exprimieren, das Klasse-I-Molekül während einer Entzündung jedoch nicht verstärkt exprimieren.

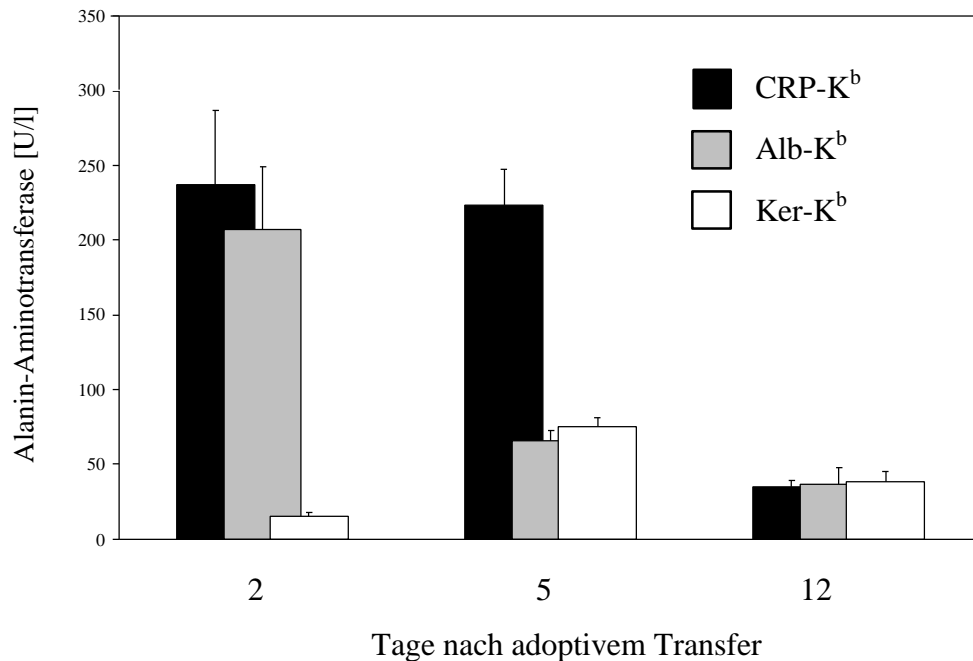


Abb. 8 : Der autoimmune Leberschaden ist transient.

Je 4 CRP-K^b (schwarze Balken), Alb-K^b (graue Balken) und Ker-K^b (weiße Balken) Tiere wurden an Tag -1 und Tag 0 mit je 40µg ODN 1668 i.p. injiziert und an Tag 0 mit 10⁷ *in vitro* aktivierten DesT-Zellen adoptiv transferiert (i.v.). An Tag 2, 5 und 12 nach Transfer wurde den Tieren Blut abgenommen und der ALT-Wert im Plasma bestimmt.

CRP-K^b Tiere zeigen nach Transfer und ODN-Behandlung zwar an Tag 5 noch Leberschaden, der jedoch bis Tag 12 vollständig abgeklungen ist (Abb. 8). Eine einmalige Autoimmunattacke ist somit nicht in der Lage eine chronische Leberschädigung zu verursachen. Außerdem ist der Leberschaden, den das ODN 1668 induziert vergleichbar mit dem des ODN 1826. Die höheren Zytokinkonzentrationen, die durch ODN 1826 hervorgerufen werden sind nicht notwendig um aktivierten T-Zellen den Angriff auf Lebergewebe zu ermöglichen.

CRP-K^b Tiere weisen im Unterschied zu Alb-K^b-Tieren auch an Tag 5 noch Leberschaden auf. Ursache für die mindestens um 3 Tage länger anhaltende Autoimmunität könnte darin liegen, daß die durch ODN-verursachte Freisetzung von IL-1 und IL-6 den CRP-Promotor induziert und das Zielantigen (K^b) auf der Zelloberfläche erhöht präsentiert wird (Ferber *et al.*, 1994).

Der autoimmune Leberschaden ist sowohl in CRP-K^b als auch in Alb-K^b Tieren nur transient. Die in CRP-K^b Tieren länger anhaltende Autoaggression mag auf die durch den ODN-Effekt vermutlich höhere K^b-Expression auf Leberzellen zurückzuführen sein.

CpG-ODN induzieren eine schnelle Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, die ebenso schnell wieder abklingt. Die Serumkonzentration von IL-12, IL-6 und TNF-α nach

in vivo Injektion von ODN 1668 in C57BL/6-Tiere erreichen ein Maximum nach 2-3 Stunden und fallen in den nächsten 6 Stunden schnell wieder auf Hintergrundwerte ab (Lipford *et al.*, 1997; Sparwasser *et al.*, 1997). In BALB/c hingegen führt die einmalige Injektion der gleichen Menge (10 µg) CpG-ODN zu erhöhten IL-12 Konzentrationen im Serum der Tiere für mindestens 8 Tage (Krieg *et al.*, 1998). Sollte der transiente Leberschaden auf dem kurzzeitigen Effekt des ODN beruhen und nicht auf der nachlassenden Aktivität der transferierten T-Zellen, sollte die Möglichkeit bestehen die Autoimmunität zu reinduzieren oder zu verlängern, indem die ODN-vermittelte Entzündung erneut induziert oder aufrecht erhalten wird. Um diese Fragen zu beantworten, wurden Alb-K^b und Ker-K^b Tiere nach ODN-Vorbehandlung und adoptivem Transfer aktivierter T-Zellen entweder nach Abklingen des Schadens an Tag 7 oder noch während des Leberschadens an Tag 2 erneut mit 40 µg ODN 1668 behandelt.

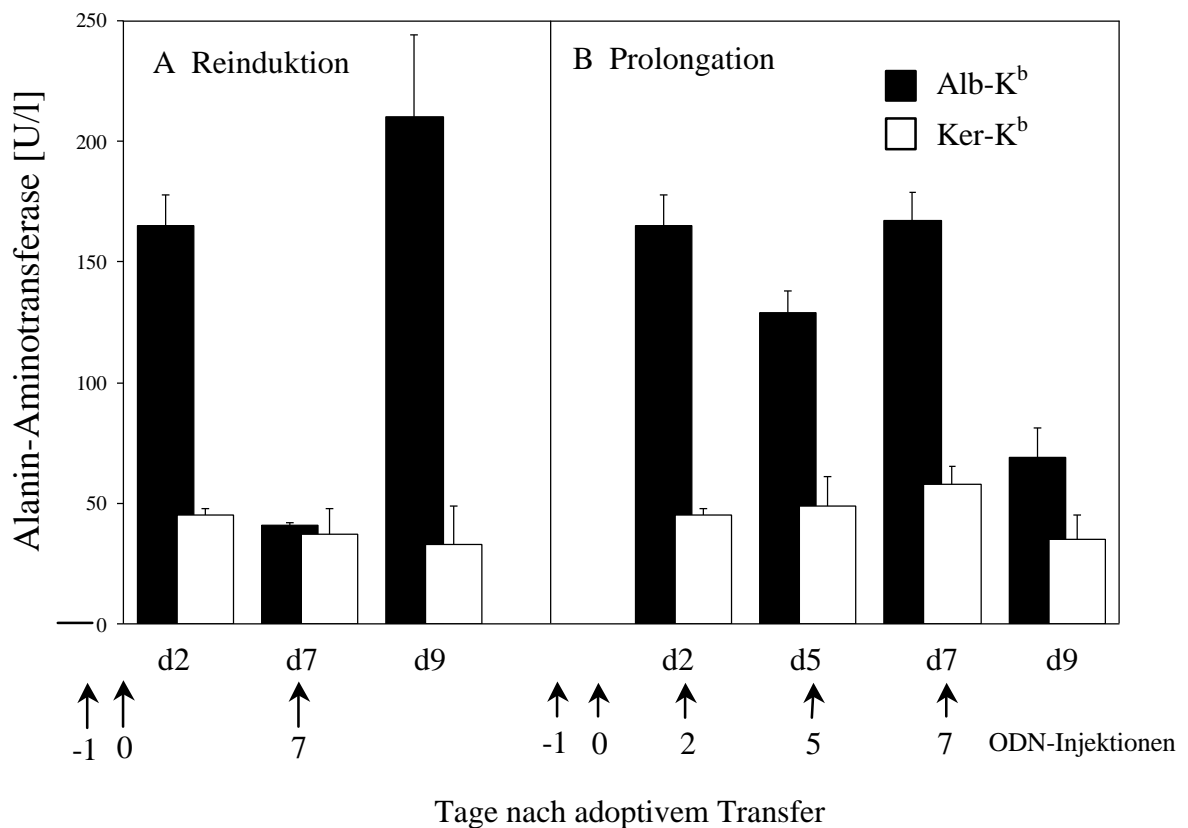


Abb. 9 : Der autoimmune Leberschaden kann durch zusätzliche ODN-Gaben reinduziert oder verlängert werden. Alb-K^b (schwarze Balken) und Ker-K^b (weiße Balken) Tiere wurden an Tag -1 und Tag 0 mit je 40 µg ODN 1668 i.p. injiziert und an Tag 0 mit 10⁷ *in vitro* aktivierten DesT-Zellen i.v. adoptiv transferiert. A) Bei der Blutabnahme zur ALT-Bestimmung an Tag 7 wurden 6 Alb-K^b und 4 Ker-K^b erneut mit 40 µg ODN 1668 i.p. injiziert und 2 Tage später der ALT-Wert gemessen. B) 13 Alb-K^b und 6 Ker-K^b wurden an Tag 2, 5 und 7 nach Transfer erneut mit je 40 µg ODN 1668 i.p. injiziert und an Tag 2, 5, 7 und 9 wurden die ALT-Werte festgestellt. Die Zeitpunkte der ODN-Injektionen sind durch Pfeile markiert.

Abb. 9 faßt die Ergebnisse beider Experimente zusammen. Abb. 9a zeigt, daß der Leberschaden an Tag 7 in vergleichbarer Höhe in Alb-K^b Tieren reinduziert werden kann

während die Ker-K^b Kontrollen keinen nennenswerten Leberschaden aufweisen. Somit liegt die transiente Autoimmunität nicht in der nachlassenden T-Zell Aktivität begründet, sondern in einem Abklingen der ODN-Wirkung. Diese Interpretation wird gestützt durch das Ergebnis des zweiten Experiments (Abb. 9B). Injiziert man in Alb-K^b Tiere noch während des anfänglichen Leberschadens an Tag 2 erneut ODN 1668 kann die Autoaggression bis Tag 5 aufrecht erhalten werden. Der Schaden kann durch eine weitere Injektion an Tag 5 sogar bis Tag 7 bei 167 U/l induziert bleiben. Trotz kontinuierlicher ODN-Injektion (Tag 7) fallen dann jedoch die ALT-Werte an Tag 9 auf 69 U/l ab.

Das schnelle Abklingen der Autoaggression ist nicht durch nachlassende Aktivität der transferierten Des⁺ T-Zellen zu erklären, sondern durch einen kurzfristigen ODN-Effekt. Leberschaden läßt sich durch weitere ODN-Injektionen sowohl reinduzieren – zumindest einmal – als auch prolongieren. Allerdings ist selbst durch anhaltende Injektionen des ODN 1668 keine chronische Autoimmunität zu erzielen.

5. kontinuierliche Entzündung führt zu transienten autoimmunen Leberschaden in CRP-K^b x DesTZR-Tieren.

In den vorangegangenen Transferexperimenten konnte gezeigt werden, daß *in vitro* präaktivierte antigenspezifische T-Zellen das konditionierte antigen-exprimierende Zielorgan unabhängig von molekularer Mimikry attackieren können. Es stellt sich nun die Frage, wie antigen-spezifische T-Zellen *in vivo* aktiviert und zu einem Angriff auf körpereigenes Gewebe veranlaßt werden und welche Rolle dabei CpG-ODN-vermittelte Entzündungen spielen können. Die Entzündungsreaktion in der Leber könnte toleranten T-Zellen Zugang zu K^b auf Hepatozyten ermöglichen und gleichzeitig ein für T-Zellen stimulatorisches Mikromilieu schaffen, das eine Aktivierung autoreaktiver T-Zellen in der Leber ermöglicht.

Zu diesem Zweck wurden statt eines Transfers von aktivierten DesTZR⁺ T-Zellen in CRP-K^b Tiere CRP-K^b Tiere mit DesTZR transgenen Tieren verpaart. Die resultierenden doppeltransgenen CRP-K^b x DesTZR Tiere wurden 4-mal in einem Abstand von 2 Tagen mit je 40µg ODN 1826 behandelt und der ALT-Spiegel im Plasma der Tiere 4 und 8 Tage nach der ersten ODN-Injektion bestimmt. Im Unterschied zu den Transfer-Experimenten wurden die Tiere über 8 Tage mit ODN behandelt, um den T-Zellen ausreichend Zeit für Aktivierung, Differenzierung und Effektorfunktion zu geben. Abbildung 10B stellt die Ergebnisse aus 2 Experimenten graphisch dar.

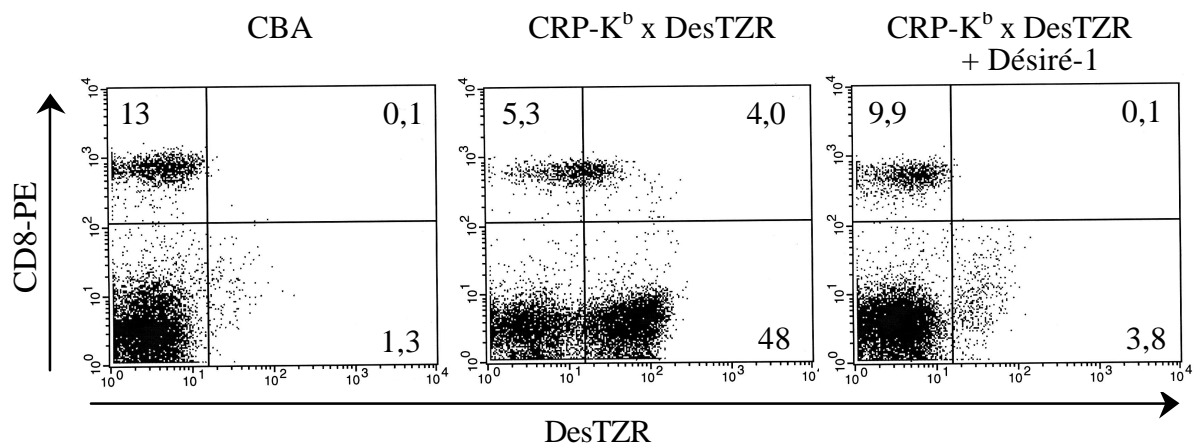


Abb. 10A : Depletion von DesTZR-positiven Zellen in CRP-K^b x DesTZR-Tieren.

CRP-K^b x DesTZR-Tiere wurden zweimal im Abstand von 5 Tagen mit je 0,5mg Désiré-1 Antikörper i.p. injiziert. Zwei Tage nach der letzten Injektionen wurde den Tieren Blut entnommen, periphere Blutlymphozyten isoliert und mit FITC-gekoppelten Antikörpern spezifisch für DesTZR (Désiré-1) und PE-gekoppelten α -CD8 Antikörper gefärbt und durchflußzytometrisch analysiert. Als Kontrollen wurden nichttransgene CBA- und nicht-depletierte CRP-K^b x DesTZR-Tiere verwendet.

CRP-K^b x DesTZR Tiere weisen schon nach 2 Injektionen von ODN 1826 (Tag 4) einen Leberschaden von 166 U/l auf, der durch zwei weitere Injektionen auf 388 U/l (Tag 8) ansteigt. Ein Großteil des Leberschadens ist abhängig von der K^b-Expression in der Leber, da Ker-K^b x DesTZR Tiere nach viermaliger Injektion von ODN 1826 „nur“ einen Schaden von 188 U/l aufweisen. Ursache dieses erhöhten ALT-Wertes in Abwesenheit von K^b in der Leber ist noch ungeklärt, könnte aber auf einem Defekt der TCR-transgenen Tiere (Linie 10402) aufgrund einer Integrationsmutation sein. Dies könnte die Tiere empfindlicher gegenüber der entzündlichen Wirkung von CpG-ODN machen. Dieser Umstand wird derzeit mit einer anderen DesTZR-transgenen Mauslinie, die die α - und β -Kette des TZR an anderer Genomstelle integriert hat (Linie 10395), untersucht. Die Relevanz des transgenen TZR zeigt sich ebenfalls in dem geringeren Leberschaden in Ker-K^b Tieren, die ein nicht-transgenes TZR-Repertoire aufweisen.

Als weitere Kontrolle für die Abhängigkeit der Leberschädigung vom transgenen TZR-Repertoire dienten sowohl CRP-K^b Tiere, die keinen transgenen TZR exprimieren, als auch CRP-K^b x DesTZR Tiere, deren Des⁺ Zellen vor den ODN-Injektionen depletiert wurden (Abb. 10A). Beide Gruppen weisen nach ODN-Injektion einen deutlich geringeren Leberschaden an beiden Meßtagen auf als ODN-behandelte CRP-K^b x DesTZR Mäuse. Der etwas geringere Leberschaden in Des-depletierten CRP-K^b x DesTZR Tieren ist möglicherweise verursacht durch die reduzierte Des⁺ T- und NK-Zell Population, die durch ODN induziertes IL-12 zu IFN- γ Sekretion angeregt werden (Trinchieri 1994; Halpern et al. 1996; Chace et al. 1997) und dadurch die Entzündung vorantreiben könnten.

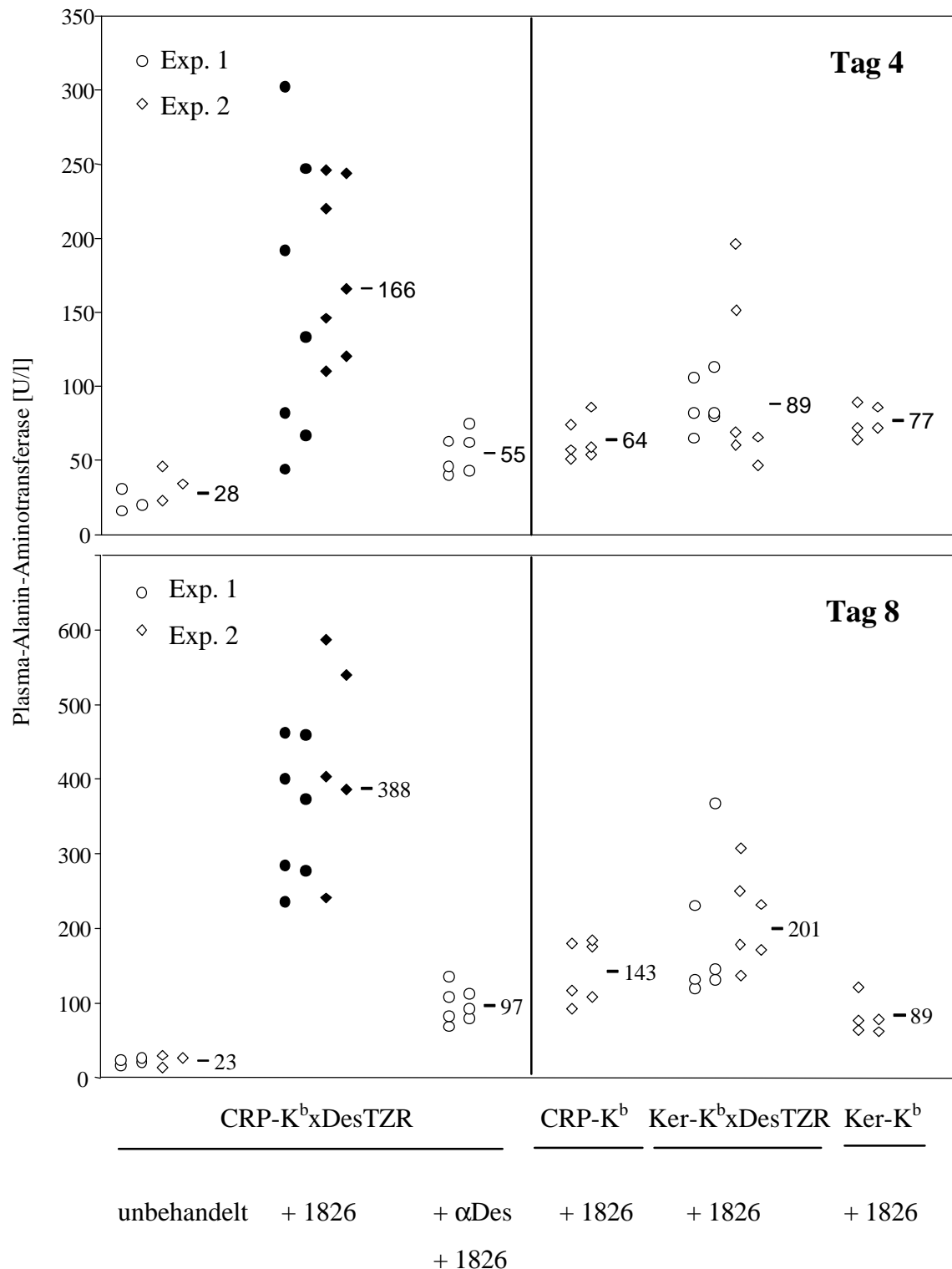


Abb. 10B : Leberschaden in mehrfach CpG-ODN-behandelten CRP-K^bxDesTZR Tieren ist von transgenen K^b-spezifischen T-Zellen und bedingt von K^b-Expression auf Hepatozyten abhängig. CRP-K^b, CRP-K^b x DesTZR, Des-T-Zellen depletierte CRP-K^b x DesTZR; Ker-K^b x DesTZR und Ker-K^b wurden mit jeweils 40µg CpG-ODN 1826 an Tag 0, 2, 4 und 6 i.p. injiziert und Plasma-ALT-Aktivität nach 2 Injektionen an Tag 4 und nach 4 Injektionen an Tag 8 bestimmt. Als Kontrollen dienten unbehandelte CRP-K^b x DesTZR Tiere. Die Ergebnisse aus 2 unabhängigen Experimenten sind getrennt angegeben (Kreise : Experiment 1; Diamanten : Experiment 2). Der Mittelwert der einzelnen Gruppen ist neben dem Querstrich vermerkt.

Dieses Experiment zeigt, daß transgene T-Zellen durch eine anhaltende Entzündungsreaktion im antigenexprimierenden Organ, aktiviert und autoaggressiv werden können. Die Autoimmunität ist jedoch abhängig von der erhöhten Frequenz transgener T-Zellen. Diese Situation ergibt sich möglicherweise bei T-Zell Proliferation im Laufe einer viralen Infektion. Virusspezifische T-Zellen können kurz nach Infektion bis zu 80% der gesamten T-Zellpopulation ausmachen.

6. CpG-ODN induziert eine Entzündungsreaktion in der Leber.

Bei den Vorarbeiten im System konnte gezeigt werden, daß eine Listerieninfektion der Leber zu Hochregulierung von MHC Klasse II Molekülen und Adhäsionsmolekülen führt, die eine verstärkte Infiltration von aktivierten T-Zellen in Leberparenchym und damit autoimmunen Schaden ermöglicht (Limmer *et al.*, 1998). Um den Effekt der CpG-ODN Injektion auf Lebergewebe genauer zu untersuchen und mit den Prozessen während einer Listerieninfektion zu vergleichen, wurden mittels Immunhistologie verschiedene inflammatorische Marker in den Lebern untersucht. Dazu wurden die Lebern von CRP-K^bxDesTZR und Ker-K^bxDesTZR Tieren, die 4 Injektionen innerhalb von 6 Tagen CpG-ODN 1826 erhalten hatten an Tag 2 nach der letzten Injektion, in Stickstoff-gekühltem Isopentan schockgefroren und anschließend Kryoschnitte mittels Immunhistologie auf die Expression von VCAM-1, ICAM-1, MHC Klasse II und DesTZR hin untersucht (Abb. 11 und 12).

CRP-K^bxDesTZR-Tiere, die mit CpG-ODN behandelt wurden zeigen erhöhte Expression von VCAM-1 (12C), ICAM-1(12J) und MHC Klasse II Molekülen (11J) auf sinusoidalen Leberendothelien, meist in den Bereichen mit starker Infiltration von Des⁺ T-Zellen (11C). Außerdem infiltrieren MHC Klasse II⁺ Zellen in das Leberparenchym, wobei es sich vermutlich um Kupffer-Zellen und Makrophagen handelt. Ker-K^bxDesTZR-Tiere, die auf die gleiche Weise behandelt wurden, unterscheiden sich histologisch nicht (11F und M, 12F und M). Die Abwesenheit des Antigens hat somit keinen Einfluss auf die Infiltration von Des⁺ T-Zellen oder die Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen. CRP-K^bxDesTZR-Tiere, die mit ODN 1720 behandelt wurden zeigen keine Unterschiede zu unbehandelten Tieren, bis auf die etwas schwächere Expression von ICAM-1 auf den Endothelien der großen Lebergefäße (12I). Dies könnte durch die Induktion von TGF- β erklärt werden, was *in vitro* gezeigt werden konnte (Limmer A, persönliche Kommunikation). Hier zeigt sich erneut die begrenzte Zugänglichkeit des Lebergewebes für Des⁺ T-Zellen in Abwesenheit einer Entzündungsreaktion.

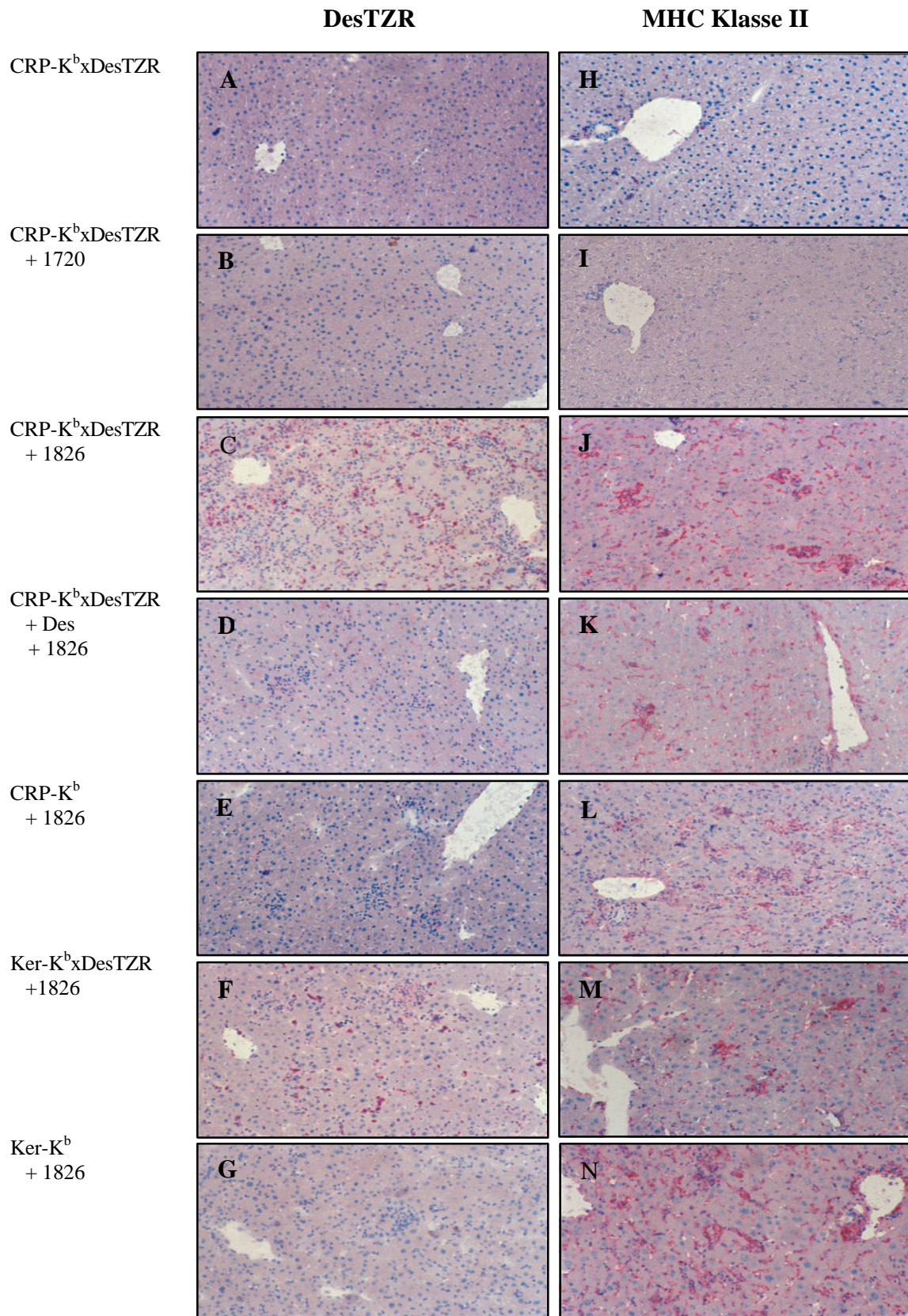


Abb. 11 : Anwesenheit von DesTZR- und MHC-Klasse II - positiven Zellen in Lebern von ODN-behandelten.

Kryoschnitte der Lebern von verschiedenen Gruppen wurden hergestellt : 4-malige i.p. Injektion von CpG-ODN 1826 in CRP-K^bxDesTZR- (C, J), Des-depletierten CRP-K^bxDesTZR- (D, K), CRP-K^b- (E, L), Ker-K^bxDesTZR- (F, M) sowie Ker-K^b-Tieren (G, N). Außerdem Lebern un behandelter (A, H) und 4x mit ODN-1720-behandelter CRP-K^bxDesTZR-Tiere (B, I). Die Schnitte wurden mit Ratten-Antikörpern gegen DesTZR (B20.2.2; A-G) oder MHC Klasse II (P7/7; H-N) inkubiert und Bindung des Erstantikörpers mit Kaninchen-anti-Ratten-IgG-Zweitantikörper und Alkalische Phosphatase-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Drittantikörper und anschließender Substratreaktion sichtbar gemacht.

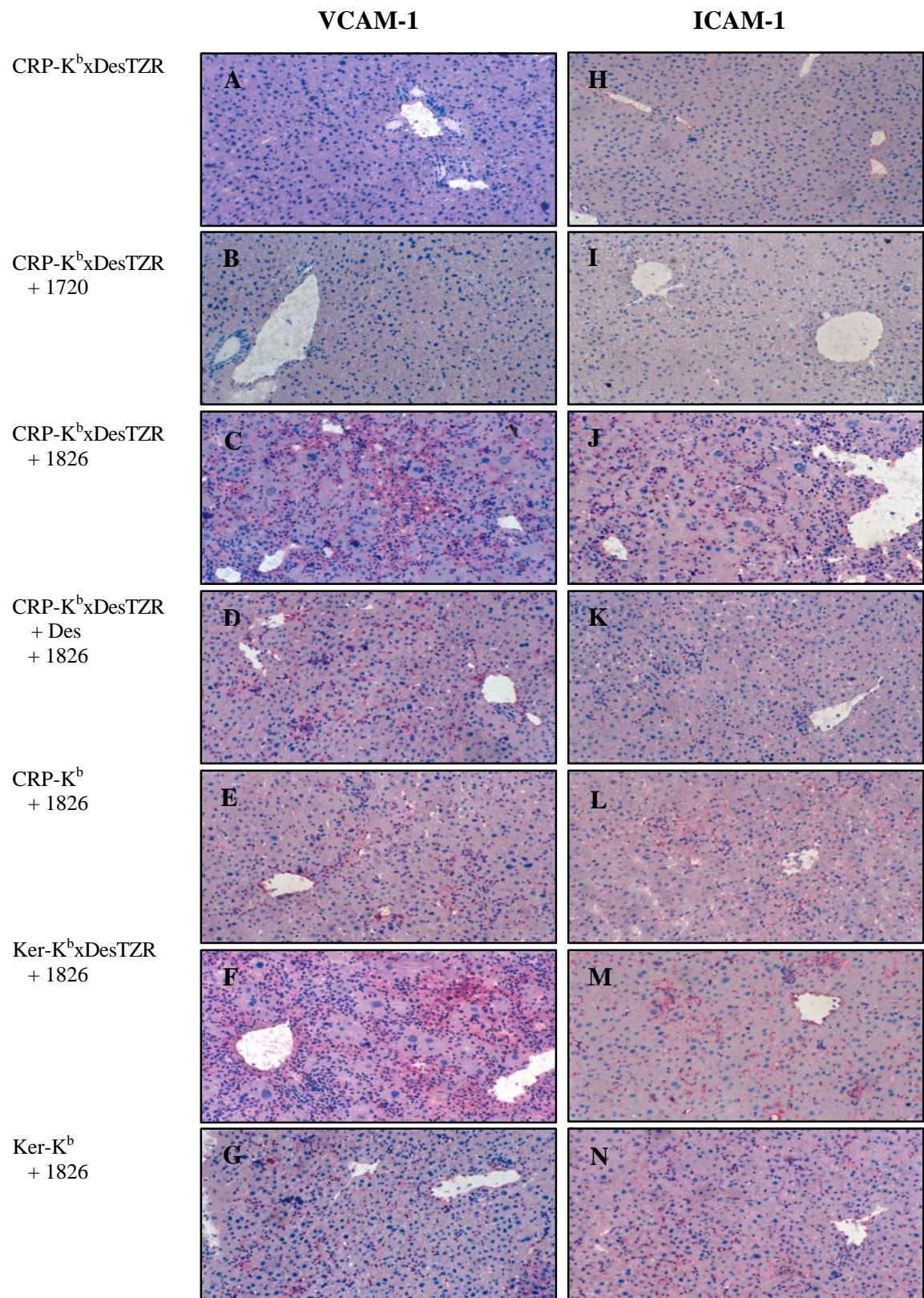


Abb. 12 : Immunhistologischer Nachweis von VCAM-1 und ICAM-1 in Lebern unterschiedlich behandelter Gruppen.

Kryoschnitte der Lebern von verschiedenen Gruppen wurden hergestellt : 4-malige i.p. Injektion von CpG-ODN 1826 in CRP-K^bxDesTZR- (C, J), Des-depletierten CRP-K^bxDesTZR- (D, K), CRP-K^b- (E, L), Ker-K^bxDesTZR- (F, M) sowie Ker-K^b-Tieren (G, N). Außerdem Lebern unbehandelter (A, H) und 4x mit ODN-1720-behandelter CRP-K^bxDesTZR-Tiere (B, I). Die Schnitte wurden mit Ratten-Antikörpern gegen VCAM-1 (MK-2; A-G) oder ICAM-1 (YN1/1.7.4; H-N) inkubiert und Bindung des Erstantikörpers mit Kaninchen-anti-Ratten-IgG-Zweitantikörper und Alkalische Phosphatase-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Drittantikörper und anschließender Substratreaktion sichtbar gemacht.

Die Abwesenheit von Des⁺ Zellen in Lebern von 1826 behandelten Des-depletierten Tieren zeigt die Vollständigkeit der Depletion (11D). Alle anderen getesteten Parameter sind schwächer ausgeprägt als bei nicht-depletierten CRP-K^bxDesTZRTieren. Das betrifft die Expression von ICAM-1 (12K), VCAM-1 (12D) und MHC-Klasse II (11K) aber auch die Infiltration von DesTZR-negativen Zellen ins Leberparenchym (11D). Dies würde für eine Beteiligung von Des⁺ Zellen an der Konditionierung der Leber sprechen. Welche Subpopulation (CD8⁺, CD4⁺ oder CD8⁻CD4⁻NK1.1⁺) hierfür verantwortlich ist kann auf diese Weise nicht unterschieden werden. Die Sekretion von IFN-γ durch NK1.1⁺ Zellen scheint jedoch ein guter Kandidat für die Beteiligung an der Konditionierung der Leber zu sein. ODN 1826-behandelte CRP-K^b Tiere weisen eine ähnlich starke Infiltration mononukleärer Des⁻ Zellen auf (11E) wie gleichbehandelte CRP-K^bxDesTZR. Die Anwesenheit von Des⁺ Zellen in der Leber hat somit keinen zusätzlichen Effekt auf die Infiltration. Adhäsionsmoleküle und MHC Klasse II⁺-Zellen scheinen jedoch ähnlich reduziert wie in Des-depletierten CRP-K^bxDesTZR-Gruppe. Ker-K^b Tiere, die mit ODN 1826 injiziert wurden zeigen nur bei der etwas schwächeren VCAM-1-Expression (12G) einen Unterschied zur Ker-K^bxDesTZR-Gruppe.

Die histologische Analyse zeigt, daß die in vivo Behandlung mit CpG-ODN Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, VCAM-1 und MHC Klasse II Moleküle hochreguliert und Infiltration mononukleärer Zellen ins Leberparenchym induziert. In Bezug auf die gemessenen Parameter ersetzen CpG-ODN somit eine Listerieninfektion und können Lebergewebe konditionieren.

7. ODN induziert Anreicherung von CD8⁺ Des⁺ Zellen selektiv in der Leber

Um zu untersuchen, ob die Anwesenheit von K^b in einer CpG-ODN konditionierten Leber von DesTZRxCRP-K^b Tieren zu einer selektiven Anreicherung von CD8 Des⁺ Zellen führt, wurden jeweils drei CRP-K^bxDesTZR-, Ker-K^bxDesTZR- und DesTZR-Tiere zweimal im Abstand von 2 Tagen mit je 40µg CpG-ODN 1826 i.p. injiziert und 2 Tage nach der letzten Injektion Lebern und Milzen entnommen. Nach Isolierung der Leber-assoziierten Lymphozyten und Herstellung einer Milzzellsuspension wurden diese Zellen in einer Dreifarbenfluoreszenz-Färbung auf die Oberflächenexpression von DesTZR, CD8 und CD4 durchflußzytometrisch untersucht. DesTZR-Tiere exprimieren den transgenen TZR nicht nur auf CD8⁺, sondern auch auf CD4⁺ T-Zellen. Ursache dafür ist die nicht stringente allele Exklusion der α-Kette des TZR (Blüthmann et al.; Berg et al.; Sha *et al.*, alle 1988). Es kommt in einem Teil der transgenen T-Zellen zu einer Rekombination der endogenen α-Kette

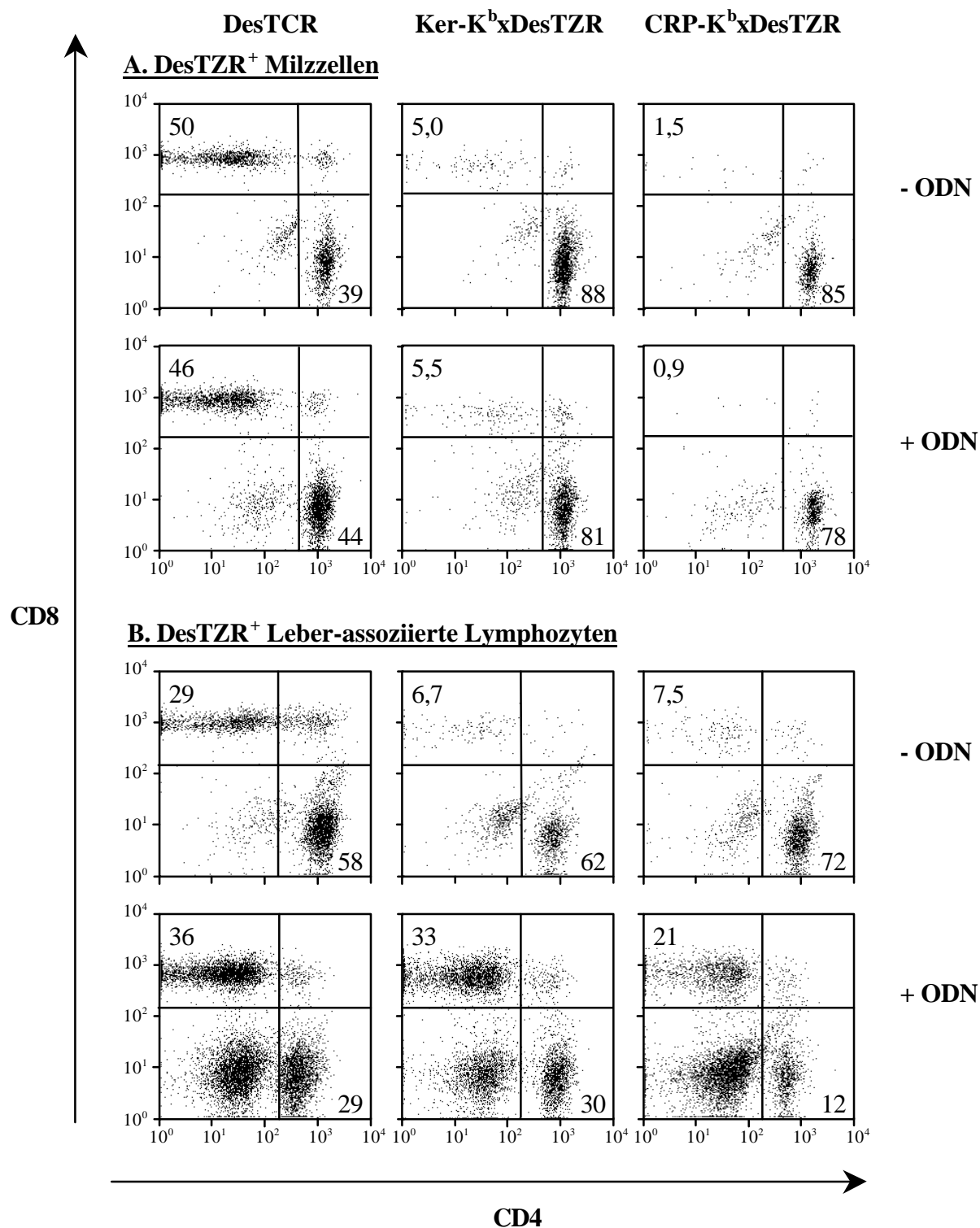


Abb. 13 : CpG-ODN induziert eine präferentielle Zunahme von CD8⁺ Des⁺ T-Zellen in der Leber.

DesTZR, Ker-K^b x DesTZR und CRP-K^b x DesTZR-Tiere blieben unbehandelt oder wurden zweimal innerhalb von 2 Tagen mit 40µg ODN 1826 i.p. injiziert. Zwei Tage nach der zweiten Injektion wurden Lebern und Milzen entnommen. Suspensionen aus Milzzellen (A) und Leber-assoziierten Lymphozyten (B) wurden mit Antikörpern gegen DesTZR (Désiré-1-FITC), CD8 (PE) und CD4 (Biotin) inkubiert. CD4-bio wurde mit dem Zweitreagenz Streptavidin-Red670 detektiert. DesTZR⁺ mononukleäre Zellen der Suspensionen wurden analysiert auf die Expression von CD4 und CD8.

und damit zur Expression eines zweiten Rezeptors auf der Zelloberfläche, der für MHC Klasse II-Moleküle spezifisch sein kann und so zur Ausbildung einer CD4⁺ Des⁺-T-Zelle führt. Das Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺ Des⁺-T-Zellen kann zur Analyse einer präferentiellen relativen Ansammlung von CD8⁺-DesT-Zellen genutzt werden.

Abbildung 13 und Tabelle 1 fassen die Ergebnisse zusammen. In der Leber kann eine selektive Anreicherung von CD8⁺ gegenüber CD4⁺ Des⁺ Zellen festgestellt werden, die am stärksten in ODN-behandelten CRP-K^bxDesTZR Tieren ausfällt (um das 17-fache). Dies könnte auf die Anwesenheit von K^b in der Leber hindeuten, die zu einem Zurückhalten der Des⁺CD8⁺ T-Zellen führt. Ker-K^bxDesTZR weisen mit einer 11-fachen relativen Anreicherung von CD8⁺ T-Zellen nach ODN-Applikation allerdings auch einen recht hohen Faktor im Vergleich zu DesTZR-Tieren (2,5-fach) auf. Dieser Effekt der CD8-Ansammlung ist leberspezifisch, da er nicht in der Milz beobachtet werden kann.

ODN 1826	DesTZR ⁺ Milzlymphozyten			DesTZR ⁺ LAL		
	T	TxK	TxC	T	TxK	TxC
-	1,2	0,06	0,02	0,5	0,1	0,1
+	1,0	0,06	0,01	1,2	1,1	1,7
rel. Zunahme der CD8⁺Des⁺ Zellen	x0,8	x1	x0,5	x2,5	x11	x17,5

Tabelle 1 : Verhältnis von CD8 zu CD4 Des⁺ T-Zellen in Leber und Milz vor und nach CpG-ODN-Applikation.

DesTZR, Ker-K^bxDesTZR und CRP-K^bxDesTZR wurden mit ODN wie in Abbildung 13 beschrieben behandelt. Das Quotient von CD8⁺ zu CD4⁺ Des⁺ Zellen wurde von unbehandelten und ODN 1826-Tieren für Milz und Leber-assoziierten Lymphozyten berechnet. Zusätzlich ist die faktorielle Veränderung des relativen Anteils von CD8-Zellen zwischen unbehandelten und ODN-behandelten Tieren angegeben. Abkürzungen; T : DesTZR; TxK : DesTZR⁺Ker-K^b; TxC : DesTZR⁺CRP-K^b; LAL : Leber-assoziierte Lymphozyten.

Applikation von ODN 1826 führt innerhalb der Des⁺-Population zu einer selektiven Anreicherung von CD8 T-Zellen in der Leber und nicht in der Milz. Dieser Effekt ist nur zum Teil abhängig von der K^b-Expression in der Leber.

8. Anhaltende Injektion von ODN führt nicht zu chronischer selbsterhaltender Autoaggression

Abbildung 10B zeigt, daß nach 4-maliger Injektion von ODN 1826 ein signifikanter Leberschaden von 350 U/l an Tag8 in CRP-K^b x DesTCR zu beobachten ist. Im Folgenden soll geklärt werden, ob in diesen doppeltransgenen Tieren im Unterschied zum Transfer-

Model der autoimmune Leberschaden durch kontinuierliche ODN-Injektion chronisch werden kann.

Abbildung 14 zeigt das Ergebnis dieses Experiments. CRP-K^b x DesTZR Tiere, die 24 mal alle 2-3 Tage mit ODN 1826 i.p. behandelt wurden, zeigen an Tag 9 ein Maximum im Leberschaden und fallen dann kontinuierlich auf leicht erhöhte ALT-Werte ab, während bei ODN 1720 behandelten Kontrollen zu keinem Zeitpunkt der Behandlung erhöhte Werte nachweisbar sind und somit nicht von unbehandelten Tieren zu unterscheiden sind. Setzt man bei ODN 1826 behandelten CRP-K^b x DesTZR Tieren die ODN-Injektion nach 53 Tagen ab so ist der Leberschaden 12 Tage später zwar noch nicht auf Hintergrundwerte abgesunken erreicht diese jedoch nach weiteren 12 Tagen.

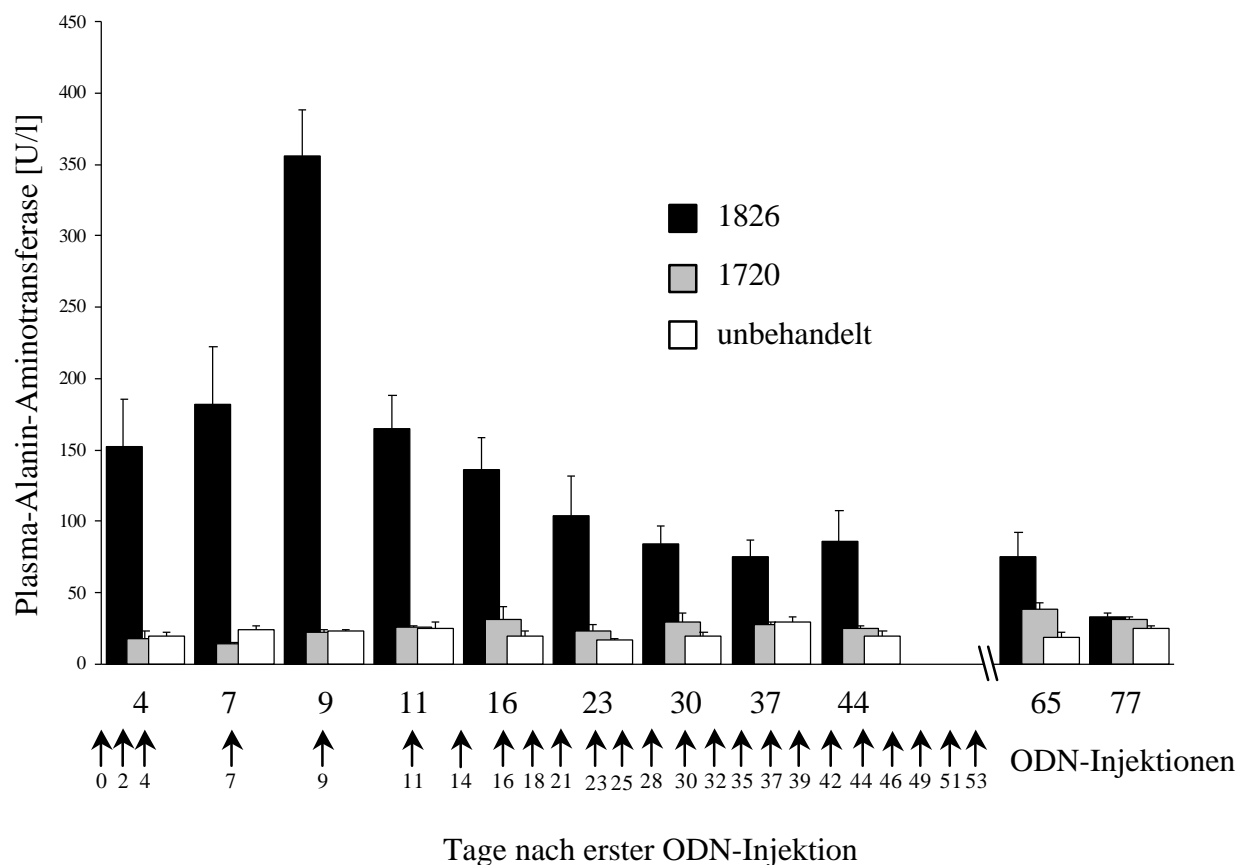


Abb. 14 : Anhaltende Injektionen von CpG-ODN führen zu starkem *transienten* Leberschaden in CRP-K^b x DesTZR Tieren.

CRP-K^b x DesTZR Tiere wurden in Abständen von 2 - 3 Tagen beginnend an Tag 0 mit jeweils 40µg ODN 1826 (schwarze Balken; 13 Tiere) oder 1720 (graue Balken; 10 Tiere) über einen Zeitraum von 53 Tagen i.p. injiziert (Pfeile). An den angegebenen Tagen wurden die Tiere geblutet und die Plasma-ALT-Aktivität bestimmt. Die Bestimmung des ALT-Wertes an Tag 65 erfolgte 12 Tage nach der letzten ODN-Applikation. Als weitere Kontrollen dienten unbehandelte CRP-K^b x DesTZR Tiere (weiße Balken).

Selbst durch fast 2-monatige anhaltende Injektion von ODN 1826 ist es nicht möglich eine selbsterhaltende autoimmune Schädigung der Leber zu induzieren. Nach einem Maximum an Tag 9 fällt der Leberschaden allmählich auf normale ALT-Werte ab. Grund

hierfür mag das immunsuppressive Mikromilieu in der Leber (TGF- β , IL-10, PGE₂ u.a.) oder Inaktivierung bzw. Deletion von Des⁺ T-Zellen sein.

9. Zurückgehender Leberschaden ist mit reduzierter CD8-Zellzahl im Lebergewebe assoziiert.

Um zu untersuchen, ob der transiente Charakter des Leberschadens auf eine Veränderung der Quantität infiltrierter T-Zellen beruht wurden Lymphozyten aus Milz und Leber von CRP-K^b x DesTZR Tieren aufgereinigt, die entweder langfristig mit ODN 1826 bzw. ODN 1720, 3x mit ODN 1826 oder nicht behandelt wurden. Diese Zellen wurden mittels Durchflußzytometrie auf die Oberflächenexpression von CD4 und CD8 hin untersucht.

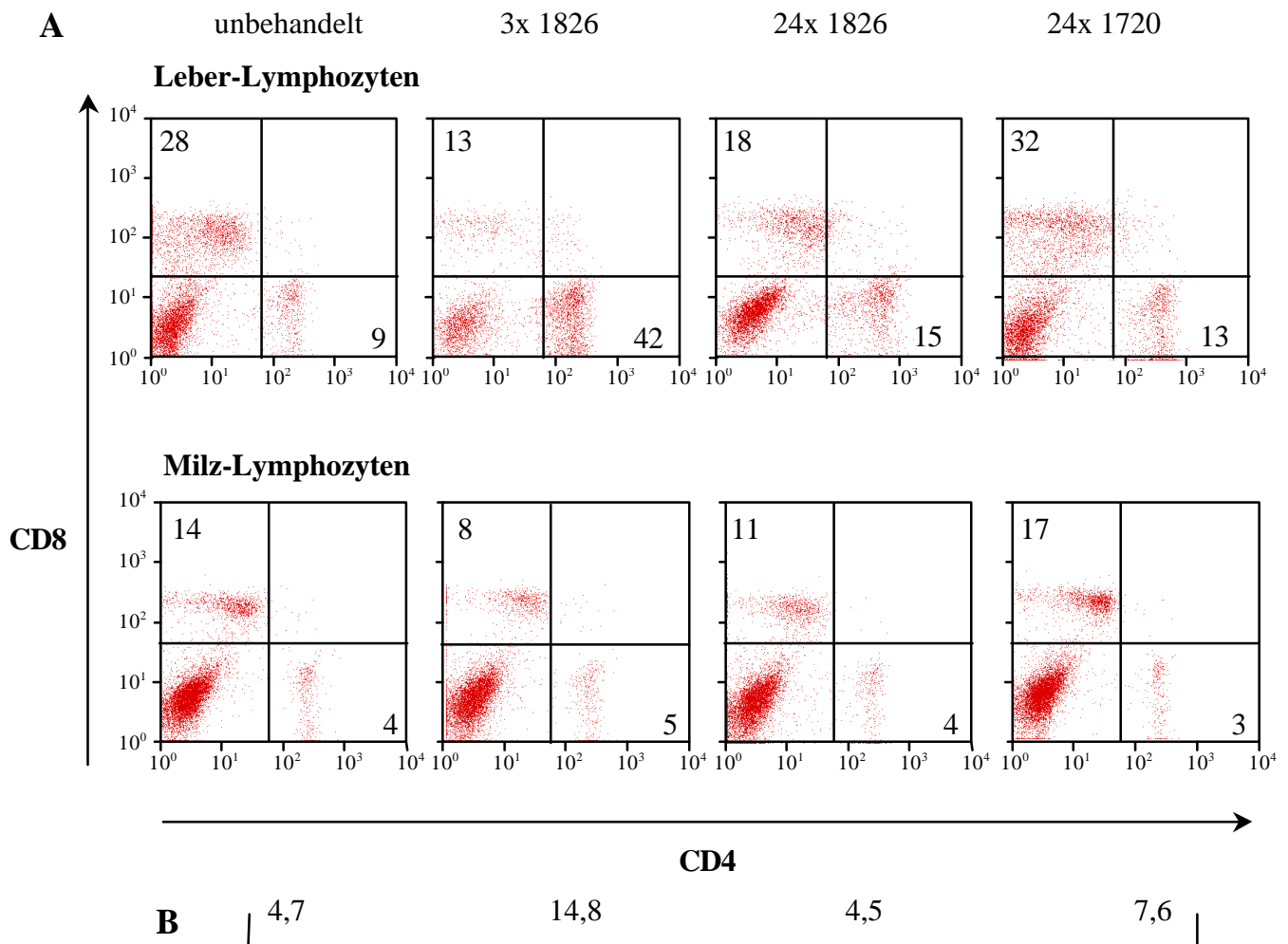


Abb. 15 : ODN induziert *in vivo* Anreicherung von CD8⁺ Zellen selektiv in der Leber :

A. CD4 und CD8 Oberflächenexpression auf Leber-Lymphozyten und Milz-Lymphozyten von CRP-K^bxDesTCR-Tieren, die entweder nicht, 3 mal bzw. 24 mal mit ODN 1826 oder 24 mal mit je 40µg ODN 1720 i.p. behandelt wurden. B. Zahl isolierter Leber-assoziiierter Lymphozyten (x10⁶).

Abbildung 15A zeigt, daß kurzzeitig mit ODN 1826 behandelten im Vergleich zu unbehandelten CRP-K^b x DesTZR Tiere eine selektiv Zunahme der CD8⁺ T-Zellen in der Leber aber nicht in der Milz zu sehen ist. Diese Zunahme an CD8 Zellen in der Leber spiegelt sich in der Zunahme der Gesamt-Lymphozytenzahl, die aus der Leber isoliert wurden wieder (Abb. 15 B). Sie steigt von $4,7 \times 10^6$ bei unbehandelten auf $14,8 \times 10^6$ bei 3x ODN injizierten CRP-K^b x DesTZR Tieren um das Dreifache an. Betrachtet man die absoluten Zahlen von CD4 und CD8 Zellen, dann nimmt die Zahl der CD4 Zellen von $1,3$ auf $1,9 \times 10^6$ um das 0,5-fache zu. CD8 Zellen steigen jedoch von $0,4$ auf $6,2 \times 10^6$ Zellen um das 15-fache an. Betrachtet man nun die CRP-K^b x DesTZR Tiere, die 24 mal mit ODN 1826 injiziert wurden, ist das Verhältnis von CD8 zu CD4 von $4,5 : 1$ auf $1 : 1$ deutlich zurückgegangen. Gleichzeitig nahm die Gesamtlymphozytenzahl in der Leber von $14,7$ nach dreimaliger ODN-Injektion auf $7,6 \times 10^6$ Zellen ab, befindet sich jedoch immer noch deutlich über der Zellzahl der unbehandelten oder Langzeit-ODN 1720 behandelten Gruppe. Die Abnahme der Lymphozytenzahl in der Leber korreliert mit der abnehmenden Leberschädigung. Ob beide Faktoren jedoch ursächlich miteinander verbunden sind, ist noch unklar und Gegenstand weiterer Experimente.

Die abnehmende Leberschädigung in CRP-K^b x DesTZR Tieren, die mit ODN 1826 langzeitbehandelt wurden, korreliert mit der im Vergleich zu kurzzeitiger Behandlung reduzierten Leber-Lymphozytenzahl. Davon sind präferentiell CD8-Zellen betroffen.

10. Hepatozyten aus ODN-behandelten CRP-K^b Tieren zeigen Marker von professionellen APZ.

In den vorangegangenen Kapiteln wurde beschrieben, daß die Injektion des immunstimulatorischen ODN 1826 eine K^b-spezifische Autoimmunität induziert werden konnte. Gleichzeitig reicherten sich Des⁺CD8-Zellen selektiv in der Leber an. Damit ist jedoch noch nicht geklärt, wo DesT-Zellen aktiviert werden. Es ist gängige Lehrmeinung, daß naive T-Zellen ausschließlich in sekundären lymphatischen Organen durch reife Dendritische Zellen oder auf aktivierten Makrophagen oder B-Zellen stimuliert werden können. Da in unserem Mausmodell K^b unter der Kontrolle des CRP-Promotors steht wird dieses MHC Klasse I Molekül ausschließlich auf Hepatozyten exprimiert. Ein Wandern von Klasse I Molekülen von Hepatozyten auf professionelle APZ mit nachfolgender Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen ist bis jetzt noch nicht in der Literatur beschrieben. Im folgenden Versuch soll der Frage nachgegangen werden, ob Hepatozyten als die einzigen K^b-

präsentierenden Zellen in CRP-K^b Tieren prinzipiell in der Lage sein könnten T-Zellen zu aktivieren. Hierzu wurden CRP-K^b Tiere 2x mit 40µg ODN 1668 behandelt, 2 Tage später Hepatozyten isoliert und mittels Durchflußzytometrie auf die Oberflächenexpression von MHC- und kostimulatorischen Molekülen untersucht.

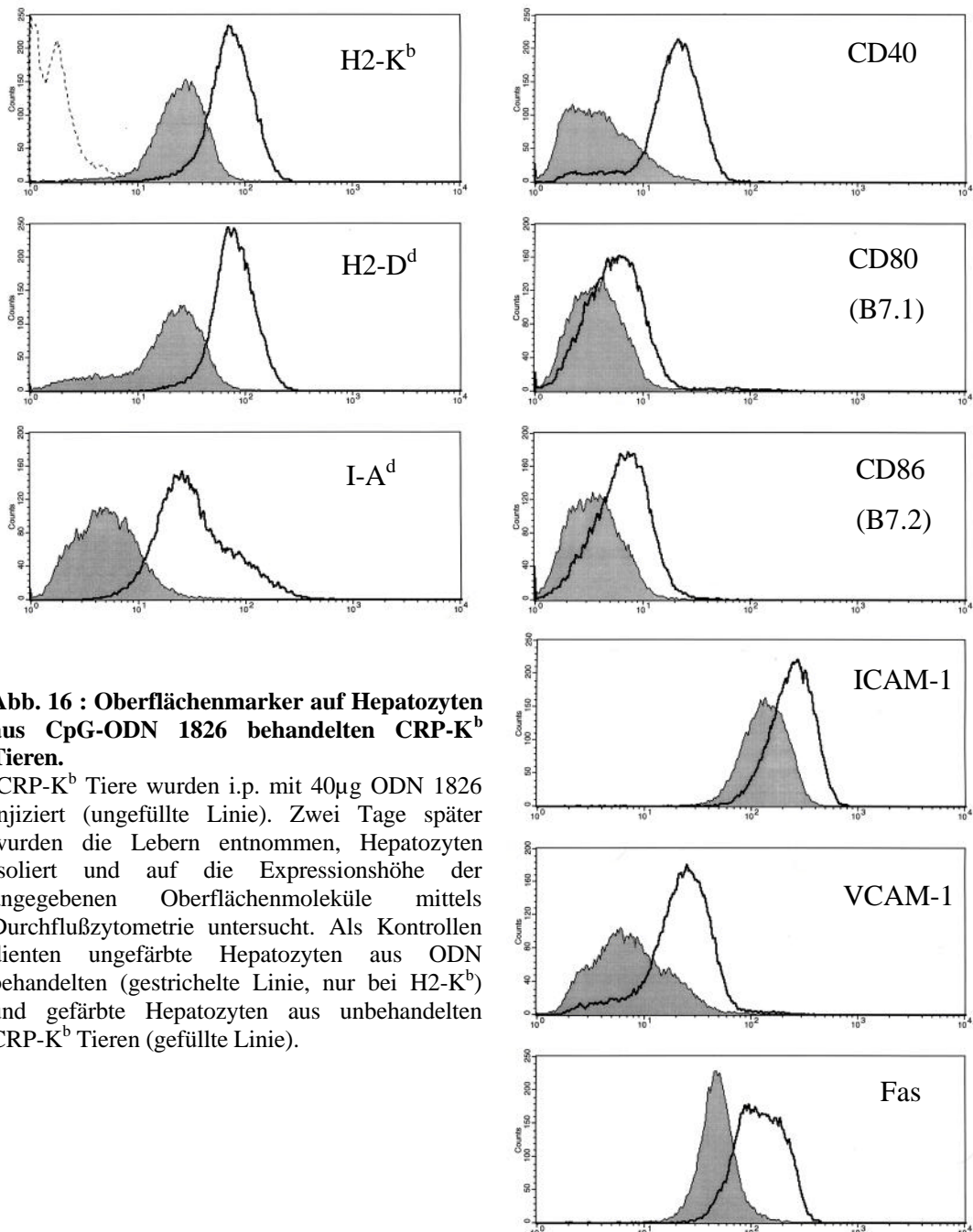


Abb. 16 : Oberflächenmarker auf Hepatozyten aus CpG-ODN 1826 behandelten CRP-K^b Tieren.

CRP-K^b Tiere wurden i.p. mit 40µg ODN 1826 injiziert (ungefüllte Linie). Zwei Tage später wurden die Lebern entnommen, Hepatozyten isoliert und auf die Expressionshöhe der angegebenen Oberflächenmoleküle mittels Durchflußzytometrie untersucht. Als Kontrollen dienten ungefärbte Hepatozyten aus ODN behandelten (gestrichelte Linie, nur bei H2-K^b) und gefärbte Hepatozyten aus unbehandelten CRP-K^b Tieren (gefüllte Linie).

Die FACScan-Analyse ergab, daß Hepatozyten aus ODN 1668 behandelten CRP-K^b Tieren kostimulatorische Moleküle wie z.B. B7.1, B7.2 und CD40 erhöht exprimieren. Gleichzeitig werden transgene (K^b) als auch endogene Klasse I- (D^d) bzw. Klasse II-Moleküle (A^d) hochreguliert. Auch Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und VCAM-1 werden in der

Expression angehoben. Die Anwesenheit all dieser stimulatorischen und kostimulatorischen Moleküle legt nahe, daß Hepatozyten in der Lage sein sollten naive T-Zellen zu stimulieren. Ob diese Schlußfolgerung richtig ist soll in *in vitro* Experimenten in nächster Zukunft festgestellt werden. Die Beobachtung, daß Fas-Rezeptor (CD95) stärker auf der Zelloberfläche erscheint, macht die Hepatozyten möglicherweise auch empfindlicher gegenüber Fas-vermittelter Apoptoseinduktion durch DesT-Zellen.

Hepatozyten aus ODN 1668 behandelten CRP-K^b Tieren zeigen erhöhte Expression von MHC- (K^b, D^d, A^d) und kostimulatorischen Molekülen (B7.1, B7.2, CD40) sowie von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1) und ähneln somit professionellen APZ. Dies könnte erklären, daß ODN-Injektion in CRP-K^b Tiere zu K^b-spezifischer Autoimmunität gegen Lebergewebe führt.

11. Zusammenfassung des ersten Teils :

Die Rolle von Entzündungsreaktionen bei der Entstehung von T-Zell-vermittelter Autoaggression.

Im ersten Teil der Arbeit sollte die Rolle von Entzündungsreaktionen in der Aktivierungs- und Effektorphase von autoreaktiven transgenen T-Zellen gegen ein Leberständiges allogen MHC Klasse I Molekül H-2K^b untersucht werden. Für die Induktion von Entzündungsreaktionen wurden Oligodeoxynukleotide verwendet, die ein nichtmethyliertes CpG-Dinukleotid enthalten (CpG-ODN). Folgende Aussagen konnten in diesem System getroffen werden.

- 1. Eine Entzündungsreaktion, induziert durch CpG-ODN, erlaubt aktivierten autoreaktiven K^b-spezifischen T-Zellen ihr K^b-Antigen auf Hepatozyten anzugreifen und einen autoimmunen Leberschaden zu verursachen. Kreuzreaktivität mit einem bakteriellen Epitop (molekulare Mimikry) ist nicht notwendig für die Autoimmunreaktion.*
- 2. Der CpG-vermittelte Effekt in vivo ist abhängig von IL-12.*
- 3. Der induzierte autoimmune Leberschaden ist transient kann aber durch Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion durch weitere CpG-ODN-Applikationen für einen begrenzten Zeitraum reinduziert und prolongiert werden.*
- 4. Eine Entzündungsreaktion in der Leber ermöglicht auch die Aktivierung von transgenen autoreaktiven T-Zellen gegen ihr leberständiges Antigen mit nachfolgender Autoaggression.*
- 5. Anhaltende Applikation von CpG-ODN kann den transienten Leberschaden nicht in eine chronische Autoaggression überführen.*
- 6. Autoaggression korreliert mit entzündlicher Infiltration und Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen und MHC-Klasse II-Molekülen in der Leber.*

B. Entwicklung eines Mausmodells zur Induktion von autochthonen Lebertumoren.

Im ersten Teil der Arbeit wurde ein Tier-Model vorgestellt, in dem die alleinige Präsenz aktivierter T-Zellen nicht ausreicht um *gesundes* Lebergewebe zu attackieren. Ein zweiter Schritt war notwendig – eine Entzündungsreaktion, verursacht beispielsweise durch eine bakterienspezifische Struktur wie CpG-ODN – um eine Autoaggression zu induzieren.

Im zweiten Teil der Arbeit soll ein System aufgebaut werden, das es erlaubt, die Bedeutung dieses 2-Schritt-Mechanismus für Immunreaktionen gegen *malignes* Lebergewebe zu untersuchen. Ursache dieser Fragestellung ist die Beobachtung, daß bei vielen klinischen Studien an Tumorpatienten die Anwesenheit aktivierter tumorspezifischer T-Zellen (endogener oder transferierter) nicht ausreichte um eine Tumorabstoßung zu erhalten.

Zu diesem Zweck sollte ein Mausmodell entwickelt werden, daß folgende Charakteristika aufweist :

1. *Autochthoner Tumor.* Im Unterschied zu den meisten Maus-Tumor-Modellen soll kein Transplantationstumor verwendet werden, sondern ein sogenannter autochthoner Tumor, der im Organ *in situ* entsteht und wächst. Autochthone Tumor-Modelle kommen den humanen Primärtumoren näher als Transplantationstumoren. Da Transplantationstumoren ektopisch (nicht am Entstehungsort) wachsen und als voll transformierte Zellen appliziert werden, stellen sie eher ein System für Tumormetastasen dar.
2. *Zuverlässige und schnelle Entwicklung des autochthonen Tumors.* Transgenes Onkogen. Hierfür wurde die sogenannte „frühe Region“ des SV40 verwendet, die für das große und kleine T(umor)-Antigen (SV40-Tag) des Virus kodiert. Die Verwendung dieses Onkogens weist zwei weitere Vorteile auf :
 - a) SV40-Tag transformiert Zellen nahezu aller Organe. Dies erlaubt eine Ausdehnung des Tumor-Modells auf viele verschiedene Gewebe.
 - b) SV40-Tag kann außerdem als T-Zell-Antigen verwendet werden, da einzelne Peptide über MHC-Moleküle dem Immunsystem präsentiert werden können. Es existieren verschiedene T-Zell-Rezeptor-transgene Mauslinien, die Tag-Epitope entweder auf MHC-Klasse I- (H-2K^k) oder MHC-Klasse II-Molekülen (I-A^k) erkennen können.
3. *Tumorentwicklung im Lebergewebe*, entsprechend dem Autoimmunitätsmodel der Leber. Hierzu wurde die „frühe Region“ des SV40 unter die Kontrolle des leberspezifischen Albumin-Promotors gestellt.

4. *Induzierbare Tumorentwicklung.* Die Kanzerogenese soll erst im erwachsenen Organismus beginnen und nicht schon wie bei konventionellen transgenen Onkogen-Systemen meist neonatal bzw. unkontrolliert einsetzen. Dies soll durch die Verwendung des cre/loxP-Systems erreicht werden. Hierbei soll eine von loxP-Stellen flankierte Transkriptions- und Translations-Stop-Kassette zwischen Promotor und Onkogen durch das Einbringen von cre-Rekombinase induzierbar deletiert werden, bzw. eine invertierte Tag-Sequenz in

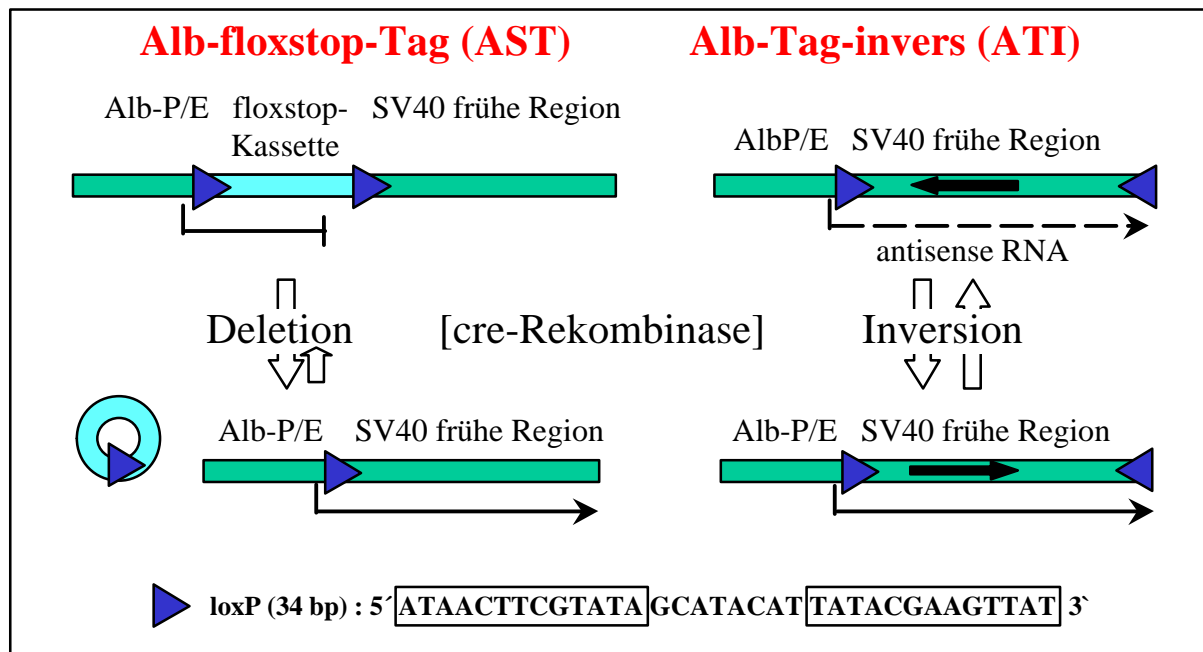


Abb. 17 : Zwei Strategien der cre/loxP-vermittelten Induktion des SV40 T-Antigens.

Im ersten Ansatz soll eine von loxP-Stellen flankierte Transkriptions- und Translations-Stop-Kassette zwischen Promotor und Onkogen durch das Einbringen von cre-Rekombinase induzierbar deletiert werden. Für die Deletion müssen die loxP-Stellen gleichsinnig an den Enden der Stop-Kassette positioniert werden. Im zweiten Ansatz soll eine invertierte Tag-Sequenz in „sense“-Orientierung gebracht werden, indem die gegensinnig orientierten loxP-Stellen durch cre rekombiniert werden, was in einer Inversion der gesamten Tag-Sequenz resultiert und Expression ermöglicht.

„sense“-Orientierung gebracht werden (Abb. 17). Der induzierbare Ansatz birgt einen weiteren Vorteil. Es sollte keine Beeinträchtigung der Züchtung aufgrund frühzeitiger tumorbedingter Lethalität auftreten.

5. *Partielle Onkogen-Expression.* Um die unphysiologische Situation zu vermeiden, daß wie bei den meisten herkömmlichen Onkogen-transgenen Systemen jede Zelle des Gewebes das Onkogen exprimiert und potentiell transformieren kann, sollte die Onkogen-Induktion nur in einem Teil der Leberzellen stattfinden können. Hierzu sind zwei Ansätze vorgesehen (Abb. 18):

- Alb-creER^{T2} transgene Tiere exprimieren konstitutiv cre als Fusionsprotein mit der mutierten Ligandbindungsdomäne des intrazellulären Steroid-Rezeptors (ER^{T2}). Das Protein wird erst nach Gabe von Tamoxifen aus dem Zytoplasma in den Nukleus transloziert und kann dort die cre-vermittelte Rekombination katalysieren (Abb 18 C).

Der Umfang der rekombinierten Zielzellen sollte mit Menge und Zahl der Tamoxifen-Injektionen regulierbar sein.

- b) Applikation von Liposomen, die einen Vektor enthalten, der cre-Rekombinase unter Kontrolle des Albumin-Promotors exprimiert. Nur ca. 1 und 5 % der Hepatozyten nehmen Liposomen nach i.v. Injektion auf und exprimieren das importierte Gen (Abb. 18B).

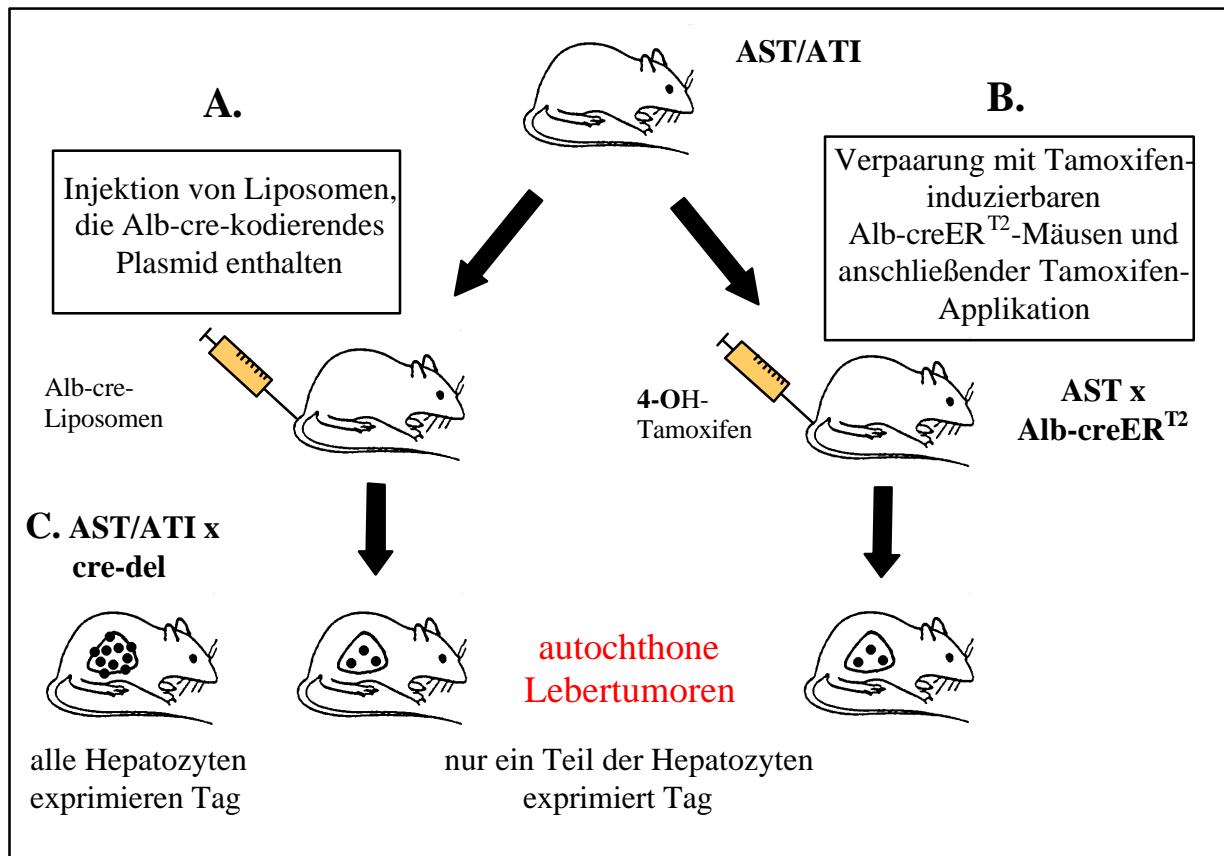


Abb. 18 : Zwei Strategien für die Applikation von cre-Rekombinase, um nur eine partielle Aktivierung des Onkogens zu erreichen.

Gefloxt Zielkonstrukt-mäuse AST oder ATI exprimieren nach Verpaarung mit cre-deleter-Tieren (C) in allen Hepatozyten SV40 T-Antigen. Injiziert man jedoch Liposomen, die ein Cre-kodierendes Plasmid enthalten in AST- oder ATI-Tiere sollte die geringe Gentransfer-Rate in Hepatozyten *in vivo* nur zu einer partiellen Induktion der Tag-Expression führen (A). Eine zweite Möglichkeit beruht in der Verpaarung der gefloxt Mäuse mit Alb-creER^{T2}-Tieren, deren cre-Rekombinase erst nach Applikation des Steroids 4-Hydroxytamoxifen in den Zellkern transloziert und Rekombination ermöglicht (B). Hierbei sollte sich die Penetranz der Rekombination über die 4-OH-Tamoxifen-Dosis regulieren lassen.

1. Herstellung konditional Onkogen-transgener Mäuse

Im ersten Teil wird die Generierung der geflochten Zielkonstrukt-Mäuse beschrieben.

1.1. DNA-Konstrukte (ATI, AST)

Herstellung der floxstop-Kassette

Das 3'-Ende des lacZ-Gens (β -Galaktosidase) inklusive SV40-Polyadenylierungssignal (3320 bis 4229 von pSV β , Clontech) wurde über Primer (5' und 3'-floxstop), deren 5'-Enden mit loxP-Sequenzen und EcoRI-Schnittstellen versehen sind, mittels PCR amplifiziert. Die beiden loxP-Sequenzen wurden in der gleichen Orientierung angehängt. Um einen verfrühten Translationsstart durch ATG-Startkodons in der nichtpalindromischen Sequenz zu vermeiden, wurden die loxP-Sequenzen in der Abb. 19 abgebildeten Orientierung eingesetzt. Die Kassette ist ca. 1kb groß und wurde von Rainer Constien hergestellt.

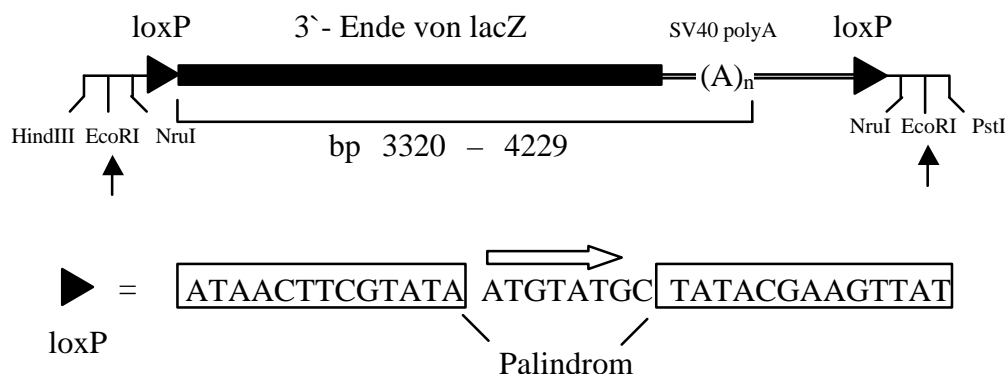


Abb. 19 : Genskizze des floxstop-Kassette (A) und der loxP-Sequenz (B).

(A) Die beiden Pfeile markieren die EcoRI-Schnittstellen, über die die Kassette in einen Vektor kloniert wurde. (B) Gensequenz der Erkennungsstelle der cre-Rekombinase. Abkürzungen : lacZ = Gensequenz der β -Galaktosidase; SV40-polyA, (A)_n = SV40 Polyadenylierungsstelle.

Herstellung des Albumin-floxstop-Tag-Konstrukts (AST)

Aus dem Plasmid pBS-SKII⁺-Tag WT (zur Verfügung gestellt von Ruth Ganß) wurde durch Doppelverdau mit XbaI und BamHI ein 2,7kb großes Fragment gewonnen, das für die frühe Region des SV40 Virus kodiert, und das über klebrige Enden in pBS-SKII⁺ (Stratagene, La Jolla, CA, USA) ligiert wurde. In die EcoRI-Schnittstelle vor dem Tag-Fragment wurde das EcoRI-verdaute PCR-Produkt der floxstop-Kassette gesetzt. Anschließend wurde die Sequenz des Albumin-Promotors und -Enhancers als 3,8kb großes SalI-Fragment in die SalI-Schnittstelle 5' vor die floxstop-Kassette zum fertigen AST-Konstrukt eingefügt (Abb. 20a). Für die Mikroinjektion in befruchtete Oozyten wurde das Konstrukt mit KpnI und SacI doppelverdaut und so von den Vektorsequenzen getrennt.

Herstellung des Albumin-floxTaginvers-Konstrukts (ATI)

Zur Herstellung des Konstrukts, in dem die Tag-Sequenz in inverser Orientierung hinter dem Albumin-Promotor positioniert und von gegenseitig orientierten loxP-Stellen flankiert ist (ATI-Konstrukt, Abb. 20b), wurde die Sequenz, die für die frühe Region des SV40 kodiert, über Primer amplifiziert, deren überstehende 5'-Enden loxP-Sequenzen und Schnittstellen für XbaI und KpnI besitzen. Die beiden loxP-Stellen gelangen dabei in entgegengesetzte Orientierung. Das PCR-Produkt wurde mit XbaI und KpnI doppelverdaut und in die entsprechenden Schnittstellen in pUC19-Alb-P/E (Pharmacia Biotech, Freiburg) eingefügt, so dass die Tag-Sequenz in inverser Orientierung 3' zum Alb-Promotor zu liegen kommt und eine Rekombination durch cre-Rekombinase zur Inversion der Tag-Sequenz und damit zur Expression führt. Das fertige Konstrukt wurde mit SphI- und KpnI-Doppelverdau von den Vektorsequenzen befreit, aufgereinigt und in Zygoten mikroinjiziert.

Beide Konstrukte wurden subkloniert und durch Sequenzierung auf ihre Fehlerfreiheit hin überprüft. Die Deletierbarkeit bzw. Invertierbarkeit der floxstop-Kassetten wurde nachgewiesen durch Transformation der fertigen Konstrukte in cre-Rekombinase exprimierende Bakterien (294-cre; Buchholz *et al.*, 1996) und anschließend Restriktionsenzymverdau.

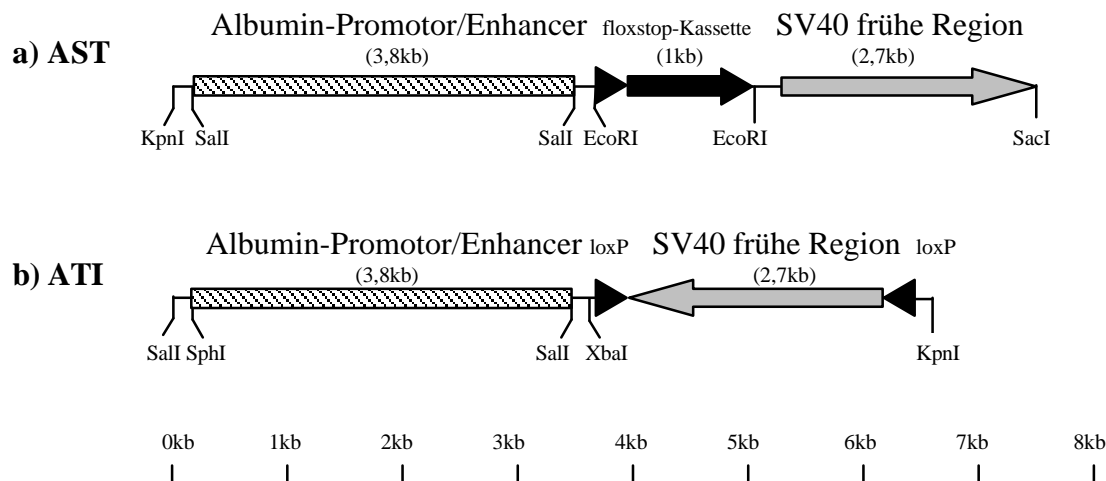
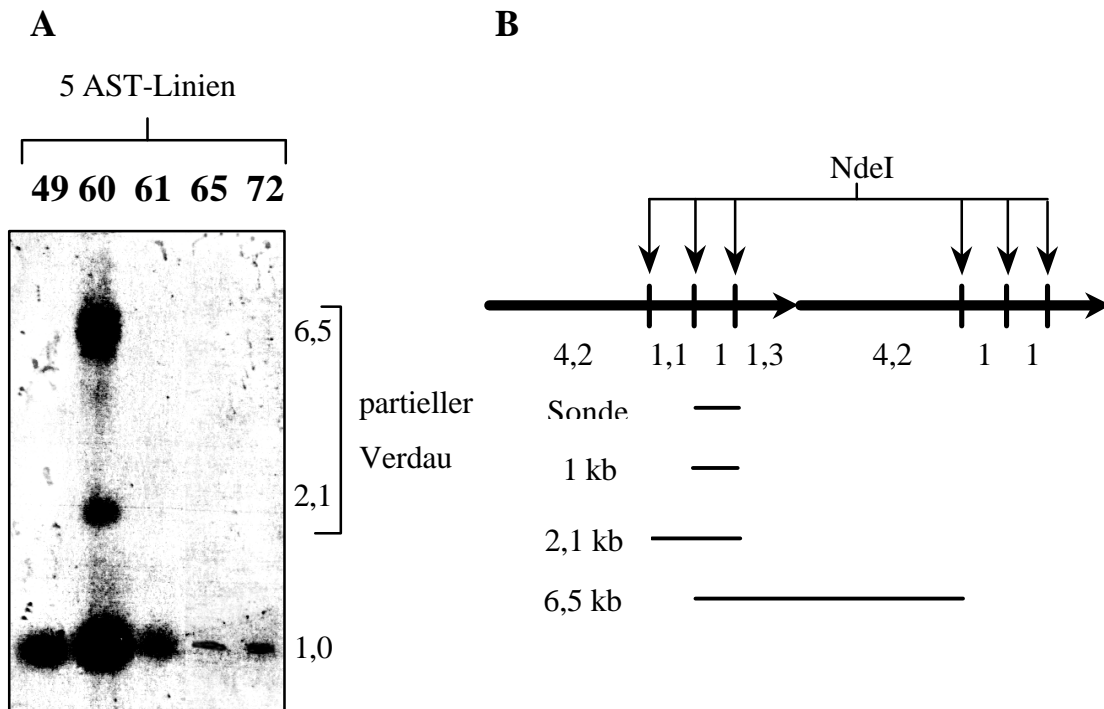


Abb. 20 : Genskizze der mikroinjizierten Alb-floxstop-Tag (AST) und Alb-floxTag-invers (ATI) DNA-Konstrukte. Abkürzungen : loxP = Erkennungssequenz der cre-Rekombinase.

1.2. Transgene Mauslinien mit Integration der AST und ATI-Konstrukte

Beide Konstrukte wurden in den männlichen Vorkern befruchteter Eizellen aus (C57BL6xCBA)F1 x (C57BL6xCBA)F1 Verpaarungen injiziert. Die manipulierten Zygoten wurden in scheinchwangere BALB/c Weibchen transferiert.

Das AST-Transgen konnte in 5 von insgesamt 74 Jungtieren mittels Southern Blot nachgewiesen werden (Linie 49, 60, 61, 65, 72; Abb. 21A). Die 5 Linien zeigen deutliche Unterschiede in der Zahl der Transgen-Kopien. Durch partiellen Verdau der Schwanz-DNA konnte bei der Linie 60 eine Kopf-zu-Schwanz-Orientierung der Transgen-Kopien sichtbar gemacht werden (Abb. 21B). Dieser Aufbau des transgenen Lokus ist von Vorteil für das induzierbare System, da somit nur Deletionen von gleichsinnig orientierten loxP-Stellen und keine unerwünschten Inversionen von gegensinnig orientierten loxP-Sequenzen möglich sind.



bb. 21 : Die 5 generierten AST-Linien unterscheiden sich in der Zahl der integrierten Transgenkopien.

A) Schwanz-DNA der verschiedenen Linien wurde mit NdeI verdaut und mit der angegebenen DNA-Sonde hybridisiert. B) Partieller NdeI-Verdau des AST-Konstrukts führt zu 3 verschieden großen Banden (Nachweis der Kopf-zu-Schwanz-Orientierung am AST-Genlokus). Abkürzungen : Tag = SV40 „frühe Region“; AST = Albumin-floxstop-Tag.

Das ATI-Konstrukt wurden in 9 von 30 Jungtieren nachgewiesen, allerdings gaben nur 2 Tiere das Transgen an die Nachkommen weiter (Linie 1, 14). Abb. 22 zeigt Southern Blot Signale für diese 2 Linien.

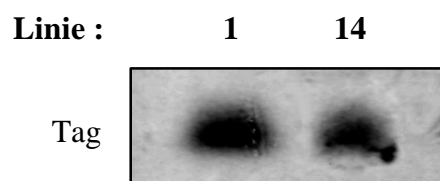


Abb. 22 : Zwei ATI-Linien konnten etabliert werden.

Schwanz-DNA von Tieren der ATI-Linien 1 und 14 wurde mit HindIII verdaut und mit einer T-Antigen-spezifischen DNA-Sonde hybridisiert.

1.3. Verpaarung der verschiedenen AST- und ATI-Linien mit cre-deleter

Um festzustellen, ob die Konstrukte in den einzelnen ATI- und AST-Linien rekombiniert werden können und Tumoren entstehen, wurde jede Linie mit Tieren verpaart, die cre-Rekombinase unter einem ubiquitären Promotor konstitutiv in allen Geweben exprimieren (Schwenk *et al.*, 1995; Lakso *et al.*, 1996).

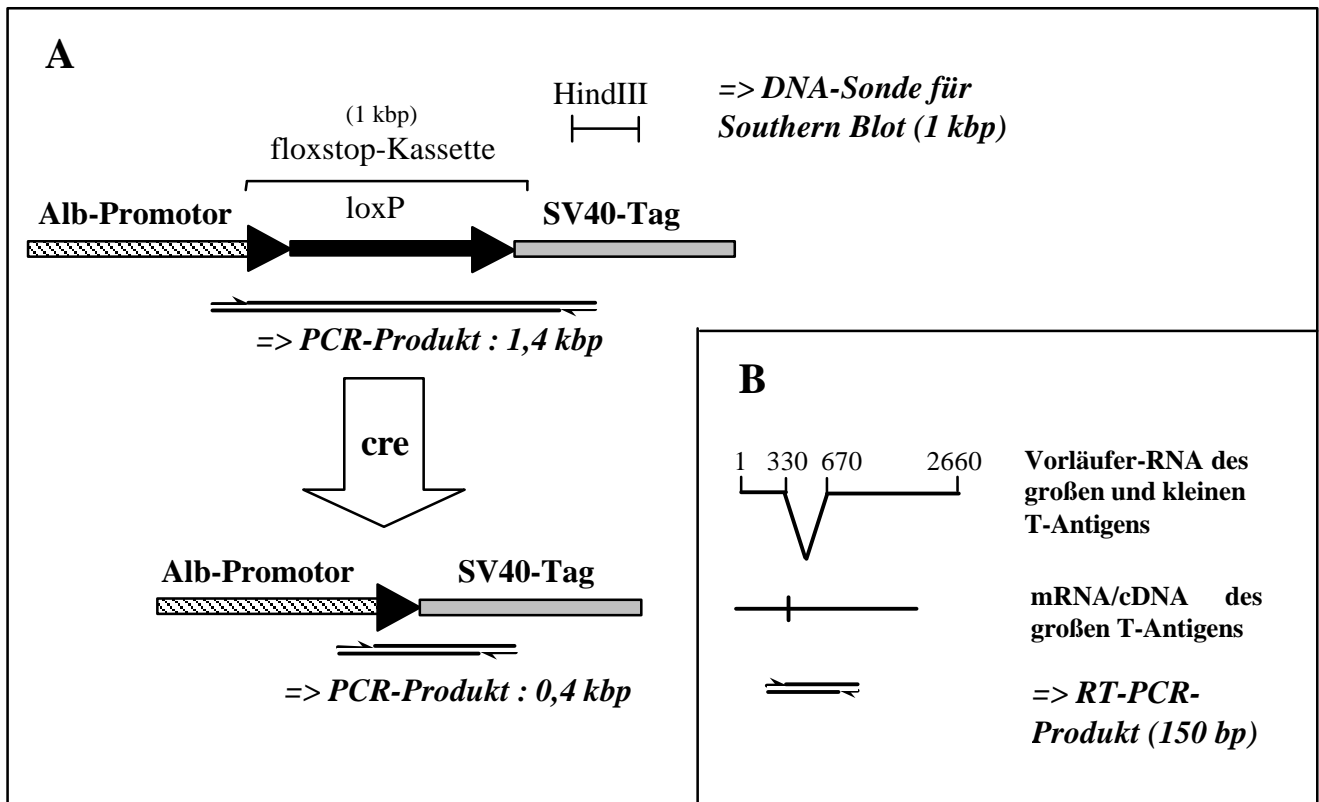


Abb. 23 : Graphische Darstellung der cre-vermittelten Rekombination des AST-Konstrukts und der Sequenzabschnitte, die mit Hilfe von PCR, Southern Blot und RT-PCR nachgewiesen werden.

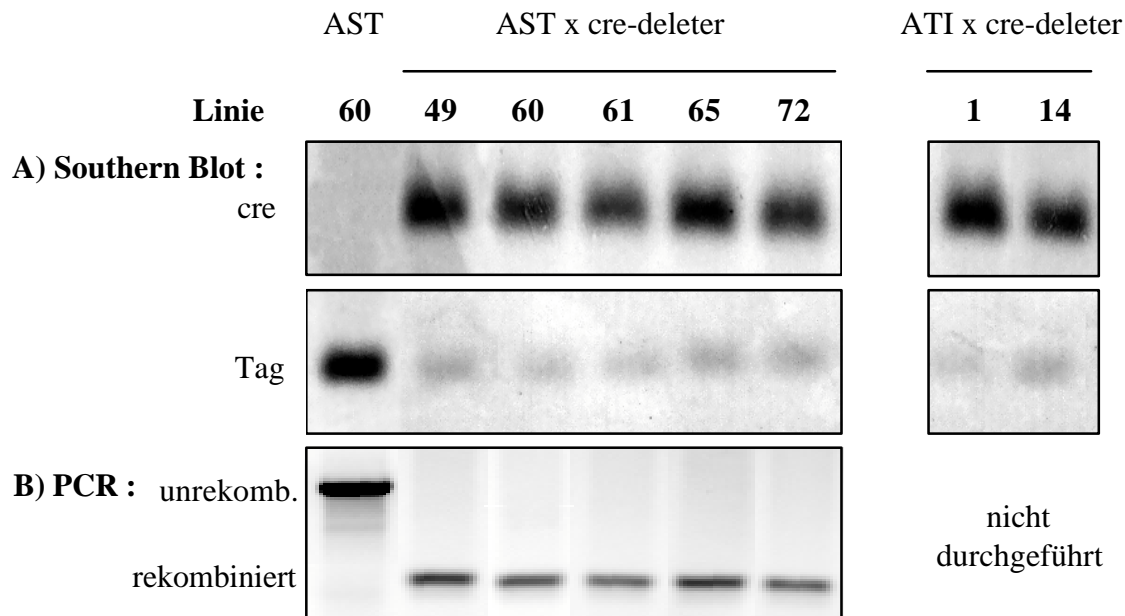
Abkürzungen : P1 = 5'-floxstop-del-Tag-Primer; P2 = 3'-floxstop-del-Tag-Primer; P3 = SV6 ; P4 = SV6 ; HIII = HindIII.

Abb. 24 zeigt die Ergebnisse von Southern Blot auf Schwanz-DNA, PCR auf Leber-DNA und Lebertumorentstehung bei ASTxcre-deleter bzw. ATIxcre-deleter Tieren. Abbildung 23A gibt einen Überblick über die verwendeten Nachweismethoden für Transgenanwesenheit und Rekombination im Mausgenom.

Alle Tiere der AST- und ATI-Linien, die zusätzlich das cre-Transgen tragen, zeigen eine deutliche Reduktion des Tag-Signals im Southern Blot im Vergleich zu einer nichtrekombinierten Kontrolle der Linie 60 (Abb. 24A). Dies erklärt sich durch eine Deletion von Sequenzen, die von gleichsinnig orientierten loxP-Stellen umrahmt sind, so daß vermutlich von mehreren integrierten Transgen-Kopien nur eine im transgenen Locus zurück bleibt. Diese Vermutung wird ebenfalls durch die gleichmäßig geringe Signalstärke bei allen

ATI- und AST-Linien nach Rekombination gestützt, obwohl die AST-einzeltransgenen Linien deutliche Unterschiede in der Kopienzahl aufweisen. Ursache der vollständigen Rekombination ist wahrscheinlich die lebenslange Expression der cre-Rekombinase in allen Zellen, die ihre Arbeit erst einstellt, wenn keine gleichsinnig orientierten loxP-Stellen mehr vorhanden sind.

Die tatsächliche Deletion der floxstop-Kassette in Lebergewebe von ASTxcre-deleter-Tieren konnte durch PCR nachgewiesen werden. Das Primerpaar wurde hierfür wie in Abb.



C) Karzinome und deren Vorformen in der Leber :

Alter								
1. – 12. Woche :	0/0	0/0	1A/6	0/0	1A+ 1K/3	5V/6	0/0	
13. – 23. Woche :	1A/3	0/0	0/5	0/2	0/2	1V+ 1A/2	0/0	
24. – 32. Woche :	0/2	0/1	0/1	0/3	0/4	2K/2	6K/6	
33. – 52. Woche :	0/0	0/4	0/6	0/2	0/0	1K/1	0/0	
Tumoren gesamt :	1/5	0/5	1/18	0/7	2/9	3/11	6/6	

Abb. 24 : DNA-Rekombination, Tag-mRNA-Expression und Tumorentwicklung in AST und ATI Linien nach Verpaarung mit „cre-deleter“ Tieren.

A) Southern Blot auf Hind III-verdaute Schwanz-DNA durch Hybridisierung mit HindIII-generierter DNA-Sonde. Die Sonde detektiert Sequenzbereiche des Tag- als auch des cre-Konstrukts. B) PCR auf Leber-DNA von ASTxcre Tieren mittels floxstop-del-Tag-Primern. C) Entwicklung von Tumorvorformen bzw. makroskopisch sichtbaren Lebertumoren. Angegeben ist die Zahl der Tiere, die Vorformen von Tumoren (V = Hyperplasien, Dysplasien, u.ä.), Adenome (A) oder Karzinome (K) tragen im Verhältnis zur Gesamtzahl analysierter Tiere. Es wurden jeweils nur die weitesten Stadien der Tumorentwicklung genannt. Abkürzungen : AST = Alb-floxstop-Tag; ATI = Albumin-floxTag invers; Tag = SV40 T-Antigene.

23A dargestellt, homolog zu Sequenzen 5' und 3' der floxstop-Kassette ausgewählt, so daß bei Rekombination ein um 1kbp kleineres PCR-Produkt entstehen muß. ASTxcre-deleter-Tiere aller 5 Linien zeigen vollständige Deletion der floxstop-Kassette. Auch hier zeigt das schwächer werdende PCR-Signal die reduzierte Transgenzahl an.

Nach dem Nachweis erfolgreicher cre-vermittelter Rekombination war die entscheidende Frage somit, ob ASTxcre-deleter bzw. ATIxcre-deleter Tiere Lebertumoren entwickeln können. Abbildung 24C faßt die Tumorentwicklung in den doppeltransgenen Tieren der 7 Linien zusammen.

Hier zeigt sich, daß die AST-Linien nur unzuverlässig Tumoren entwickeln. Nur 4 von 44 analysierten Tiere wiesen Leberkarzinome oder -adenome auf. Die wenigen tumortragenden Tiere der Linien 49, 61 und 72 zeichnen sich außerdem durch eine sehr variable Kinetik in der Tumorentstehung aus. So zeigte eines der beiden 8 Wochen alten doppeltransgenen Tiere der Linie 72 noch die gutartige Vorform (Adenom) eines Leberzellkarzinoms (Gewicht 1,3 g; entspricht dem Gewicht einer normalen Leber), während das andere, gleichalte Tier schon zahlreiche Karzinome aufwies, so daß das Lebergewicht auf 8,4g angestiegen war. Doppeltransgene Tiere der gleichen Linie, die mit bis zu 32 Wochen deutlich älter waren als die beiden eben beschriebenen zeigten allerdings keinerlei Hinweise auf Tumorentstehung.

Im Unterschied zu den AST-Linien ergab sich in den beiden ATI-Linien ein positiveres Bild. In allen analysierten doppeltransgenen ATIxcre-deleter Tieren der Linie 14 konnten Leberkarzinome nachgewiesen werden. Fünf von sechs 24 bis 32 Wochen alte Tiere trugen aufgrund massiven multifokalen Tumorwachstums 8 bis 16 g schwere Lebern. Nur ein Tier trug mit 2g einen deutlich kleineren Tumor. Linie 1 ergab ein ähnliches Bild. Alle Tiere, die älter als 24 Wochen waren hatten Leberzellkarzinome entwickelt. Abbildung 25 zeigt Lebern einer ATI und einer ATIxcre-deleter Maus im Alter von 8 Monaten. In 7 von 8 Tieren, die zwischen 6 und 24 Wochen alt waren, konnten histologisch Vorstadien der Tumorentstehung festgestellt werden. Die Entwicklung beginnt mit einzelnen hyperplastischen Hepatozyten, die häufig pleomorphe Nuklei (Abb. 26 B) und gelegentlich Kernvakuolen aufweisen. Die Gesamtleberstruktur erscheint noch wenig gestört, gehäufte und atypische (tripolare) Mitosen sind jedoch schon vermehrt anzutreffen. In dieser Phase existieren bei einigen Tieren auch entzündliche Infiltrate, die möglicherweise durch die Expression von Tag oder durch den Transformationsprozeß selbst ausgelöst werden. In späteren Stadien können sogenannte Foci auftreten, die bei Onkogen-transgenen Mäusen häufig anzutreffen sind. Diese frühen prämaligen Läsionen führen zur Entwicklung von Hepatozellulären Adenomen (Abb. 26C),

die sich durch eine scharfe Abgrenzung vom umliegenden Gewebe, sphärische Ausdehnung

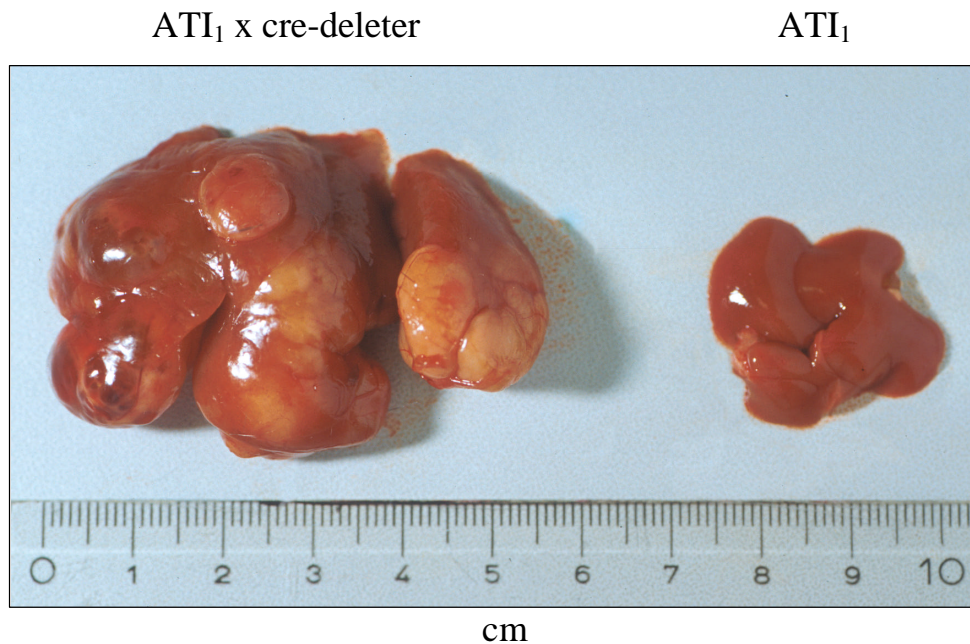


Abb. 25 : Lebern von ATI₁ (rechts) und ATI₁ x cre-deleter (links) Tieren.

Beide Tiere waren 8 Monate alt. Das Gewicht der Leber der ATI₁xcre-deleter Maus betrug 16 g, das der ATI₁-Maus nur 1,4 g bei vergleichbarem Körperrestgewicht von 25 g. Der Maßstab gibt die Größe in Zentimetern an.

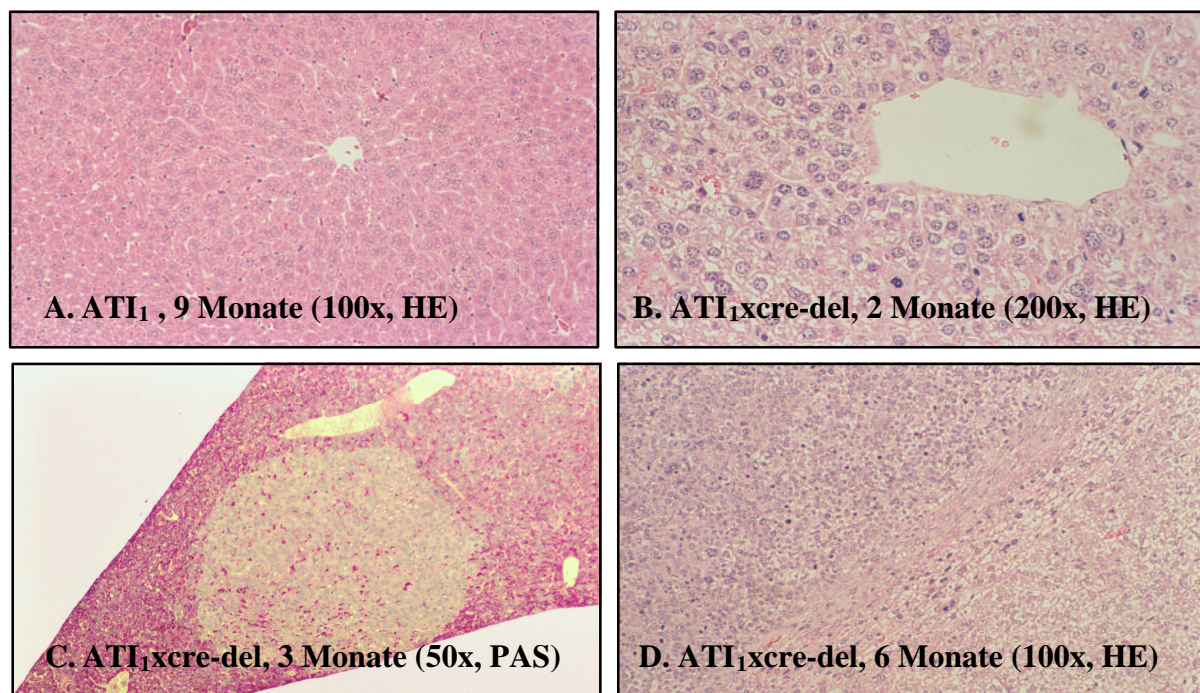


Abb. 26 : HE- und PAS-Färbungen auf Paraffinschnitten auf Lebern von AST₁ und AST₁xcre-del-Tierenn.

Paraffinschnitte der Lebern von AST₁ (A) und AST₁xcre-deleter Tieren verschiedenen Alters (B : 2 Monate; C : 3 Monate; D : 6 Monate) wurden mittels HE- bzw. PAS-Färbung behandelt, um Gewebestrukturen sichtbar zu machen. In Klammern sind die Vergrößerungen der Schnitte angegeben. HE = Hämatoxylin-Eosin; PAS = Periodic Acid Schiff (Glykogenfärbung).

und Fehlen einer Abkapselung auszeichnen. Makroskopisch sind sie aufgrund von Fetteinlagerung als helle Flecken, die über die Oberfläche erheben zu erkennen. Sie enthalten meist keine Triaden (strukturelle Einheit aus Leberpfortader, Leberarterie und Gallengängen) mehr, da diese nach außen gedrängt werden. Teilweise verlieren sie Glykogen, was durch eine PAS-Färbung sichtbar gemacht werden kann (Abb. 26C). Aus Adenomen entwickeln sich einzelne Zellen zu Hepatozellulären Karzinomen (HCC) (Abb. 26D und Abb. 25). In diesem Endstadium ist die normale Leberarchitektur nahezu vollständig zerstört. HCCe können mehrere Zentimeter Durchmesser und eine gelblich-beige (Fetteinlagerung) bis schwarze (Nekrose) Farbe annehmen. Histologisch können die vollständig transformierten Hepatozyten sowohl klein- als auch großzellig sein. Zum Teil gehen sie direkt in umliegendes Gewebe über oder bilden eine Bindegewebsschicht um sich herum aus und komprimieren benachbarte Areale (Abb. 26D). Alle Tiere der ATI-Linien, die 6 Monate oder älter waren, trugen multifokale HCC. Da alle Hepatozyten Tag exprimieren können, gibt es keine Areale in der Leber mehr, die eine unmodifizierte Struktur aufweisen. Histologisch gibt es keinen Hinweis auf Tag-Expression in anderen Leberzellen als den Hepatozyten. Gallengangsepithelzellen, Ito-Zellen, sinusoidalen Endothelzellen, Kupffer-Zellen, Dendritischen Zellen und Leber-assoziierten Lymphozyten zeigten keine Anomalien.

Die Verpaarung der 5 AST- und 2 ATI-Linien mit cre-deleter Tieren, die cre-Rekombinase in allen Körperzellen exprimieren, ergab zuverlässige und mit 6 Monaten hinreichend schnelle Entstehung von Hepatozellulären Karzinomen in beiden ATI-Linien. Von den 5 AST-Linien wiesen jedoch nur 3 Linien überhaupt Transformation auf. Da nur einzelne Tiere Adenome oder Karzinome in der Leber entwickeln schienen diese Linien ungeeignet für die weitere Verwendung.

1.4. Korrelation von Tag-Expression und Tumorentwicklung in ASTxcre-deleter und ATIxcre-deleter Tieren.

Obwohl in ASTxcre-deleter Tieren Rekombination des AST-Konstrukt stattfindet entstehen selbst in 9 Monate alten Mäusen keine makroskopisch sichtbaren Tumoren. Eine Möglichkeit dies zu erklären ist keine oder eine zu schwache Expression des großen T-Antigens. Um zu klären, ob doppeltransgene Tiere der einzelnen Linien auch mRNA des großen T-Antigens exprimieren wurde RT-PCR auf cDNA der Leber von diesen Mäusen analysiert. In Abbildung 27 ist die RT-PCR auf Leber-cDNA jeweils eines Tieres der verschiedenen Linien dargestellt. Bei Linie AST-Linie 49 und 72, sowie ATI-Linie 1 und 14

handelte es sich um tumortragende Tiere (Adenome oder Karzinome), während Tiere der Linie 60, 61 und 65 kein makroskopisch sichtbaren Tumoren aufwiesen.

Es zeigt sich, daß nur in den Tieren mit Lebertumoren Tag-Expression nachweisbar ist. Die Stärke der Expression scheint mit der Geschwindigkeit der Tumorentstehung zu korrelieren, da das Tier der Linie 72 mit starker Tag-Expression schon nach 3 Monaten ein Karzinom aufweist, während Linie 49 mit deutlich schwächerer Expression im Alter von 5 Monaten erst Adenome generiert hat. Die Ursache für die unterschiedliche Expression in den einzelnen Linien liegt vermutlich an den verschiedenen Integrationsorten der Transgene. Benachbarte regulatorische Sequenzen könnten die Aktivität des Albumin-Promotors und – Enhancers beeinflussen. Dieses Phänomen ist schon bei zahlreichen transgenen Linien beschrieben worden.

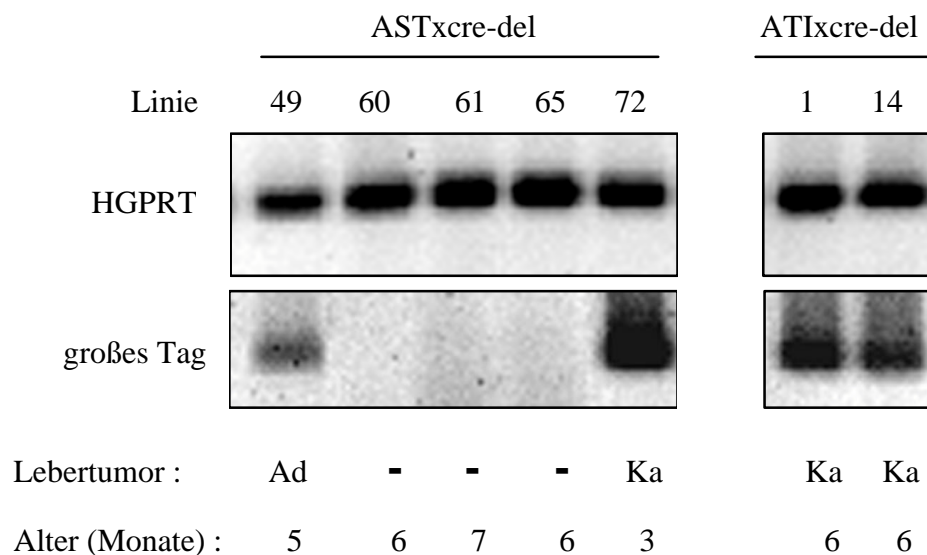


Abb. 27 : RT-PCR auf Leber-mRNA der 7 geflochten Linien nach Verpaarung mit cre-deleter.

Leber aus tumortragenden (Linie 49, 72, 1, 14) und tumorfreien Tieren (Linie 60, 61, 65) der verschiedenen Linien wurde entnommen, cDNA generiert und auf Anwesenheit von HGPRT-cDNA durch HGPRT1- und HGPRT2-Primer und cDNA des großen T-Antigens durch SV6- und SV9-Primer analysiert. Die Inzidenz von Adenomen (Ad) oder Karzinomen (Ka) und das Alter ist für die einzelnen Tiere angegeben.

1.5.Tag-Expression ohne Rekombination in ATI_{1/14}-Tieren aber nicht in AST₇₂-Tieren.

Nachdem die Zuverlässigkeit der Tumorentwicklung in doppeltransgenen Tieren untersucht war, mußte geklärt werden, ob die einzeltransgenen nicht-rekombinierten ATI (Linie 1 und 14) bzw. AST-Tiere (Linie 72) Tag-Expression oder sogar Transformation aufweisen.

In Lebern von AST₇₂-Tieren konnte keine Tag-mRNA detektiert werden (Abb. 28A). Die Stop-Kassette, die zwischen Promotor und Strukturgen eingefügt wurde verhindert somit effizient die Expression von Tag. Unerwünschte Expression wurde auch für den ATI-Lokus

untersucht. Im Unterschied zum AST-Lokus wurde hier aber eine schwache Tag-Expression mittels RT-PCR nachgewiesen, die jedoch nicht zur Transformation von Hepatozyten auszureichen scheint (Abb. 28B). Eine Erklärung für diese Beobachtung beruht auf einem transgenen Konstrukt von Hanahan (Hanahan, 1985; Adams *et al.*, 1987). Er unternahm Mikroinjektionen mit einem Konstrukt, in dem der Ratten-Insulin-Promotor in umgekehrter Orientierung vor der Tag-kodierenden Sequenz positioniert war (RIR-Tag von „Rat Insulin Reverse“). Überraschenderweise exprimierten die resultierenden transgenen Tiere Tag und

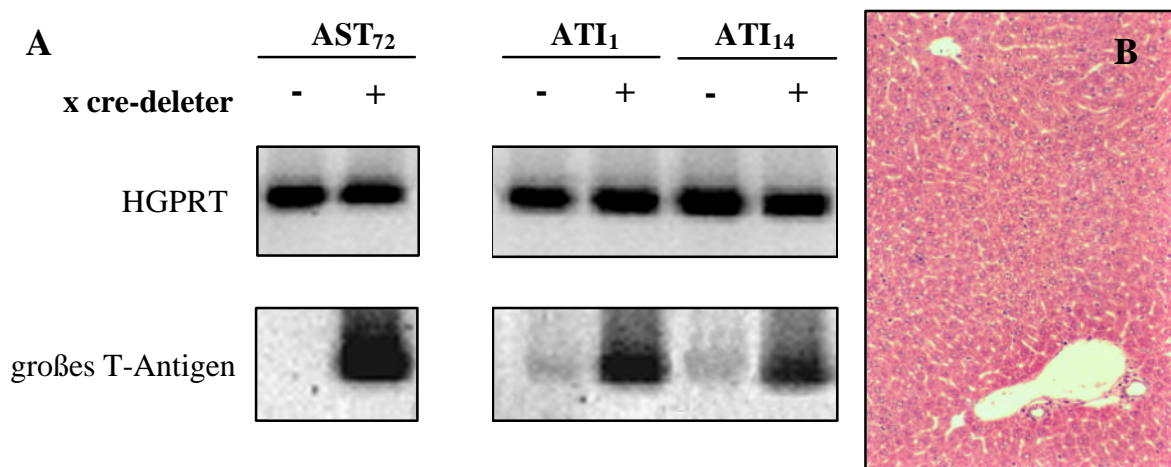


Abb. 28 : Geringe Tag-Expression in Lebern von ATI₁- und ATI₁₄-Tieren führt histologisch nicht zur Transformation von Hepatozyten.

A. Aus Lebern von AST₇₂ bzw. ATI_{1/14} einzeltransgenen und AST₇₂xcre-deleter bzw. ATI_{1/14}xcre-deleter doppeltransgenen Tieren wurde Gesamt-RNA gewonnen und in cDNA umgeschrieben. Verwendete Primer und Bedingungen der nachfolgenden PCR auf HGPRT und großes T-Antigen sind im Methodenteil beschrieben. B. Histologische Analyse eines Paraffinschnittes der Leber einer ATI₁-Maus.

entwickelten Hyperplasien in den β -Zellen des Pankreas (was bei uns jedoch nicht zu sehen ist). Bei genauer Betrachtung des ATI-Lokus unserer transgenen Tiere ergibt sich eine ähnliche Situation wie in RIR-Tag-Tieren. Ursache ist die Kopf-zu-Schwanz-Orientierung der Transgenkopien am Locus. Dabei kommt der Albumin-Promotor eines Konstrukts in umgekehrte Orientierung vor die Tag-kodierende Sequenz des benachbarten ATI-Transgens (Abb. 29). Um zu testen, ob diese Überlegung die Tag-Expression erklären kann, wurden ATI-Tiere generiert, die nur eine Transgen-Kopie tragen und bei der sich die Tag-kodierende Sequenz in der ursprünglichen inversen Orientierung befindet. Da ATIxcre-deleter-Tiere Cre auch in der Keimbahn exprimieren geben sie den rekombinierten ATI-Lokus an die Nachkommen weiter. Bei vollständiger Rekombination enthalten die Keimzellen nur eine Transgen-Kopie, die sich entweder in der Sinn- oder Gegensinn-Orientierung befindet. Durch Verpaarung mit CBA-Tieren wurde das cre-Transgen entfernt, um eine erneute Inversion zu verhindern. Die Nachkommen, deren Tag-Sequenz in Sinn- oder Gegensinn-Orientierung hinter dem Promotor positioniert ist, wurden nochmals mit CBA gekreuzt, um neue Linien zu

generieren, die erneut auf Tag-Expression getestet werden können. Abb. 30 faßt die Ergebnisse der RT-PCR und der histologischen Analyse von zwei rekombinierten ATI-Linien (ATIREK) zusammen.

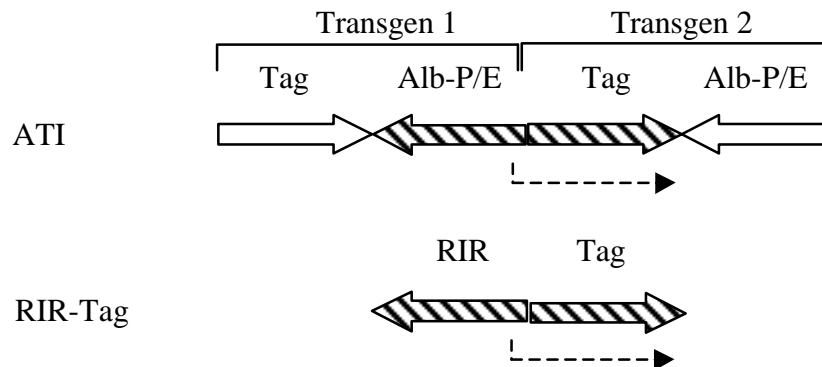


Abb. 29 : Graphischer Vergleich der Genloci in ATI und RIR-Tag Tieren.

Durch die Kopf-zu-Schwanz-Integration der ATI-Konstrukte in das Mausgenom entsteht eine Promotor-zu-Gen-Orientierung, die in RIR-Tag Tieren Expression von Tag ermöglicht. Schraffiert sind die entsprechenden Bereiche der injizierten Konstrukte. Abkürzungen : Alb-P/E = Albumin-Promotor/Enhancer; ATI = Albumin-floxTaginvers; RIP = Ratteninsulin-Promotor; RIR = Rat Insulin Reverse; Tag = großes und kleines T-Antigen von SV40.

Drei der ATI₁-Tiere weisen eine schwache Tag-Expression auf (Abb. 30A Spuren 1-3), die nicht zur Transformation von Leberzellen ausreicht. Eine der rekombinierten Linien (Abb. 30 Spur 5) zeigt keinerlei Tag-Expression während die andere ATIREK-Linie Tag nicht nur stärker exprimiert als ATI (Spur 4), sondern auch histologisch Transformation in Form von hyperplastischen Hepatozyten mit pleomorphen Nuklei und entzündlicher Infiltration nachweisbar ist.

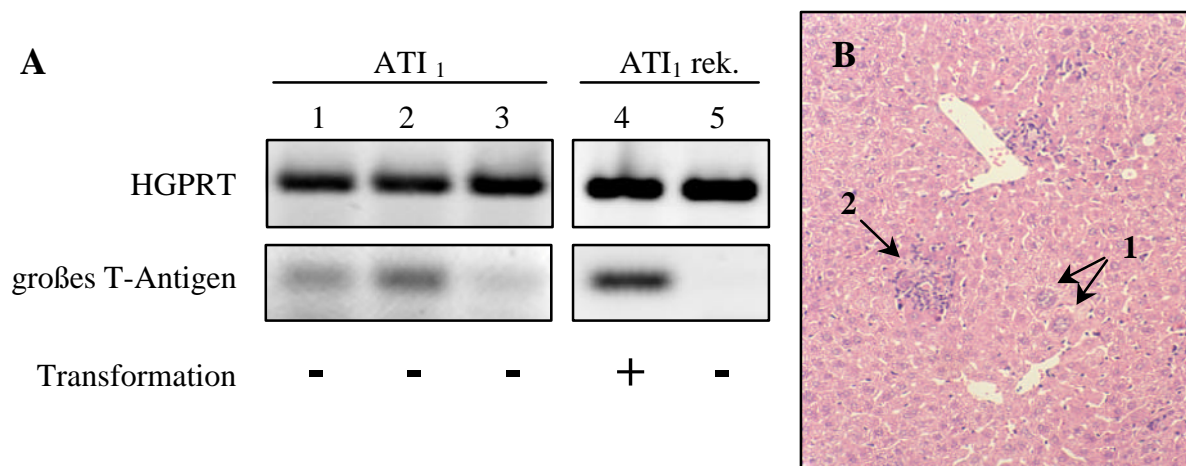


Abb. 30 : Expression der mRNA des großen T-Antigens in Lebern rekombinierter ATI-Linien.

A. ATI₁ x cre-del-Tieren wurden mit CBA verpaart. Zwei ATI₁-positive und cre-negative Nachkommen wurden erhalten und erneut mit CBA verpaart, um zwei neue Linien mit stabil rekombiniertem ATI-Lokus zu etablieren (ATI₁ rekombiniert). Diesen Nachkommen wurden zusammen mit ATI₁-Tieren im Alter von drei Monaten Lebern entnommen und RT-PCR auf HGPRT und SV40 großes T-Antigen durchgeführt. **B.** HE-Färbung auf Paraffinschnitt der Leber des Tag-exprimierenden ATI₁rek-Tieres (A. Spur 4). Markierung 1 zeigt pleomorphe Nuklei und Markierung 2 entzündliche Infiltration.

Wir konnten zwei neue Linien generieren, die jeweils nur eine Alb-floxTag-Transgen-Kopie besitzen und die Tag-Sequenz entweder in Sinn- oder Gegensinn-Orientierung enthalten. Sinnorientierung führt zu konstitutiver Tag-Expression und Transformation. Tiere mit Tag in Unsinn-Orientierung weisen keine undichte Expression mehr auf. Die nicht-exprimierende ATlrek-Linie erfüllt somit die notwendigen Kriterien, um sie in nächster Zukunft weitergehend auf ihre Induzierbarkeit zu analysieren.

1.6. Gewebespezifität der Tag-Expression und Metastasierung nach ubiquitärer Rekombination

In anderen Mausmodellen, in denen Tag unter einem leberspezifischen Promotor exprimiert wurde, führte ektoische Expression Transformation in anderen Zellen als Hepatozyten. So führte die Verwendung des α 1-Antitrypsin-Promotors zu Hyperplasien in Pankreas, Niere und Magen (Sepulveda *et al.*, 1989) und der α -Amylase-Promotor zu malignen Tumoren in braunem Fettgewebe (Fox *et al.*, 1989). Ursache dafür ist vermutlich die Integrationsstelle im Genom, wo benachbarte regulatorische Sequenzen die Steuerung des transgenen Promotors beeinflussen können. Außerdem wurde die Expression von „leberspezifischen“ Genen (CRP, SAP) unter physiologischen Bedingungen im Thymus nachgewiesen (Klein *et al.*, 1998). Neben „ektoischer“ Expression wurde auch Metastasierung bei Lebertumor-Modellen in der Maus beschrieben. Die Verwendung des Albumin-Promotors führte z.B. zu Lungenmetastasen (Sandgren *et al.*, 1989; Hino *et al.*, 1989).

Da unsere ATI₁- und ATI₁₄ –Tiere durch die Verpaarung mit cre-deleter-Tieren in Zellen aller Organe rekombinierte Konstrukte tragen, ist ausschließlich die Gewebespezifität des Albumin-Promotors entscheidend für ektoische Expression. Keines der untersuchten ATlxcree-deleter-Tiere wies makroskopisch sichtbare Abweichungen von der normalen Gewebebeschaffenheit der Organe auf. Um beide ATI-Linien eingehender auf Tumorentstehung außerhalb der Leber und Metastasierung von Hepatozellulärem Karzinom zu untersuchen wurden verschiedene Organe aus neun ATlxcree-deleter Tieren, die massive multifokale Leberzellkarzinome im fortgeschrittenen Stadium aufwiesen und zwischen 6 und 9 Monate alt waren (Abb. 25), entnommen und histologisch untersucht. Abbildung 31 zeigt repräsentative HE- bzw. PAS-Färbungen auf Paraffinschnitten von Niere, Herz, Pankreas, Milz, Lunge, Dünndarm, Nebenniere, Leber und Thymus eines Tieres.

In keinem der Organe konnte mittels histologischen Methoden eine Abnormalität festgestellt werden, die auf Metastasierung oder ektoische Transformation hinweisen würde.

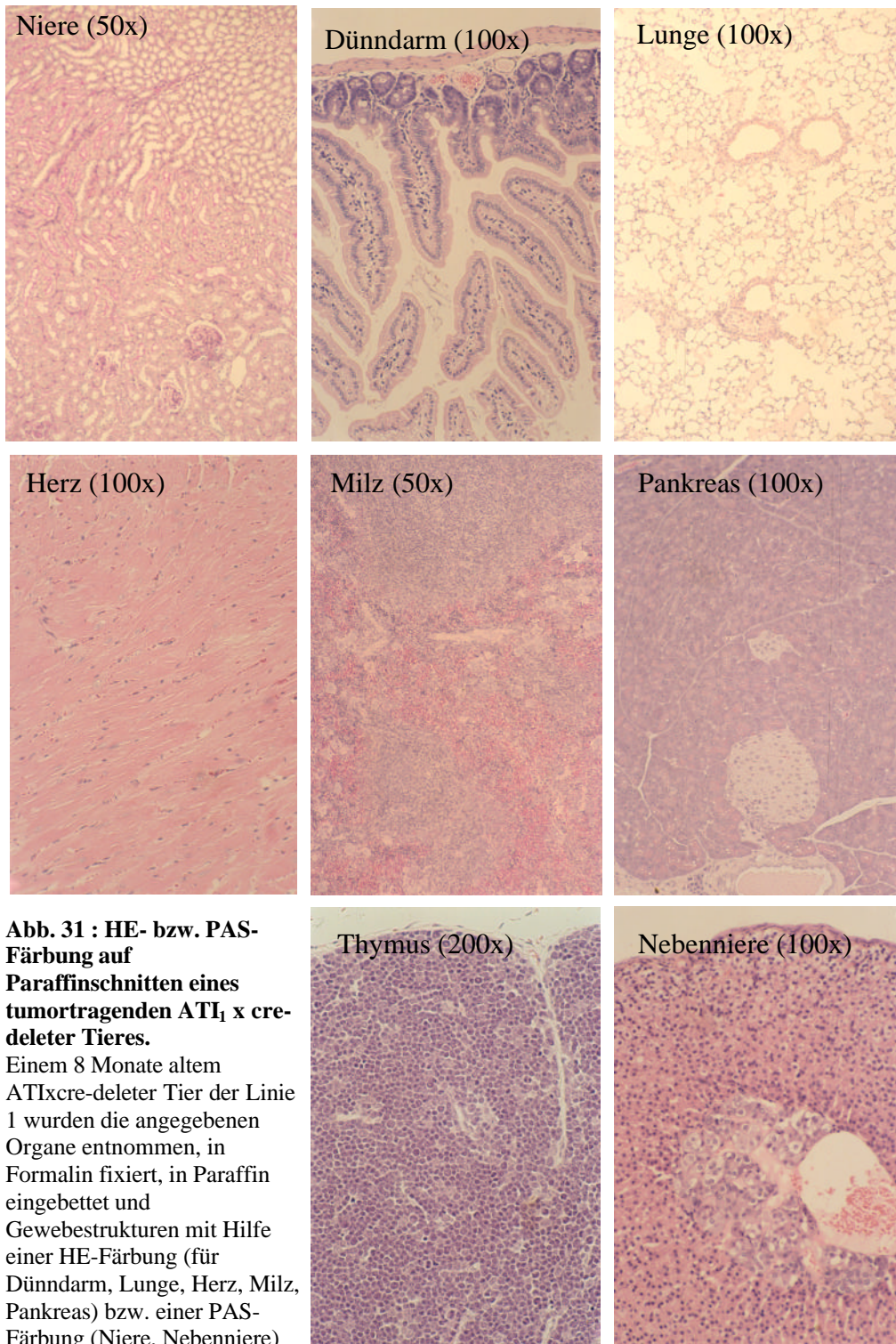


Abb. 31 : HE- bzw. PAS-Färbung auf Paraffinschnitten eines tumortragenden AT₁ x cre-deleter Tieres.

Einem 8 Monate altem AT₁xcre-deleter Tier der Linie 1 wurden die angegebenen Organe entnommen, in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und Gewebestrukturen mit Hilfe einer HE-Färbung (für Dünndarm, Lunge, Herz, Milz, Pankreas) bzw. einer PAS-Färbung (Niere, Nebenniere) sichtbar gemacht. Die Vergrößerung der Schnitte ist jeweils in Klammern vermerkt.

Somit können wir davon ausgehen, daß eine funktionell relevante Expression von Tag nur in Hepatozyten stattfindet. Auch Metastasierung in die untersuchten Organe findet zumindest bis zum Alter von 9 Monaten nicht statt.

1.7. b-Aktin-floxstop-Tag (BAST)

Die beiden beschriebenen geflochtenen Konstrukte erlauben aufgrund des Albumin-Promotors nur die Entwicklung von Lebertumoren. Um die Möglichkeit zu haben, Tumoren auch in anderen Organen induzieren zu können aber nicht für jedes Gewebe eine neue gewebespezifische geflochte Maus generieren zu müssen, wurde eine dritte geflochte transgene Maus generiert, die statt des Albumin-Promotors den Promotor des humanen β -Aktin-Gens trägt. Da β -Aktin als Bestandteil des Zytoskeletts in vermutlich allen Geweben und Entwicklungsstufen der Maus exprimiert wird, kann durch Verpaarung mit einer gewebespezifischen konstitutiven oder konditionalen cre-Maus Tumoren in den verschiedensten Geweben induziert werden. Dieser modulare Aufbau ist ein entscheidender Vorteil des cre/loxP-Systems und wird mit jeder neuen gewebespezifischen cre-transgenen Mauslinie vielseitiger einsetzbar.

Herstellung des b-Aktin-floxstop-Tag-Konstrukts (BAST)

Die Konstruktion des Plasmids erfolgte analog zum Albumin-floxstop-Tag-Konstrukt. Aus dem Plasmid pSLh β APr-lacZ-pA (von Heike Pöpperl, DKFZ Heidelberg freundlicherweise zur Verfügung gestellt) wurde der humane β -Aktin-Promotor als 4,3 kb großes Fragment über XbaI und SalI herausgenommen und in die entsprechenden Schnittstellen in pUC19 zum pUC19- β Aktin-Plasmid eingesetzt. Bevor die floxstop-Tag-Kassette in dieses Konstrukt eingefügt werden konnte, musste sie aus dem pBS-Alb-floxstop-Tag Konstrukt mit EcoRV und SpeI ausgeschnitten und über stumpfe Enden in die PvuII-Schnittstelle von pSP72 kloniert werden. Aus diesem als XhoI/SalI-Fragment gewonnen wurde die Kassette in die SalI-Schnittstelle 3' vom β -Aktin-Promotor in das pUC19- β A-Plasmid eingesetzt. Für die Mikroinjektion erfolgte ein KpnI/SalI-Doppelverdau.

Es konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt ein Gründertier identifiziert werden. Ob dieses Männchen das Transgen weitergibt und nach Verpaarung mit cre-transgenen Tieren Tumoren in verschiedenen Organen generiert wird die weitergehende Analyse zeigen.

BAST

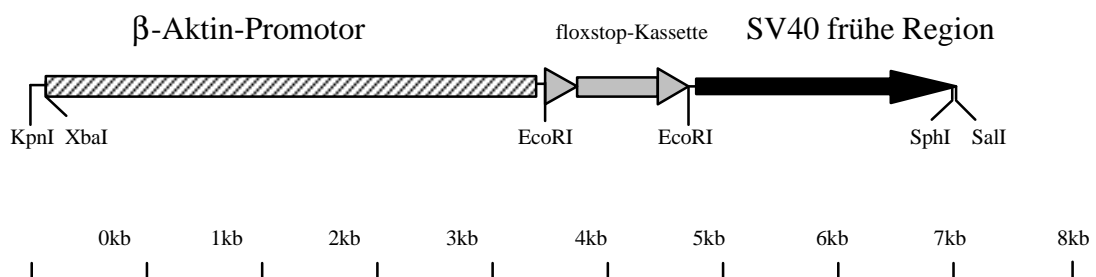


Abb. 32 : Genskizze des injizierten b-Aktin-floxstop-Tag DNA-Konstrukts.

2. Zwei Möglichkeiten cre-Rekombinase zeitlich definiert in das System einzubringen

Um die physiologische Situation der Tumorentstehung im Patienten möglichst nahe zu kommen soll die Kanzerogenese erst im erwachsenen Tier zu einem definierten Zeitpunkt induziert werden können. Außerdem soll nur ein Teil der Hepatozyten Tag nach Induktion exprimieren, um die Situation in herkömmlichen Onkogen-transgenen Mäusen zu verhindern, in denen alle Zellen eines Gewebes das Onkogen herstellen und damit der Kampf gegen den Tumor aussichtslos ist.

Wir haben uns für 2 unterschiedliche Möglichkeiten entschieden dieses Anliegen zu realisieren. Erstens die Generierung von transgenen Tieren, die cre-Rekombinase als Fusionsprotein mit der mutierten Ligandbindedomäne des Östrogenrezeptors (creER^{T2}) exprimieren, das erst nach Zugabe von 4-Hydroxy-Tamoxifen aus dem Zytosol in den Kern transloziert wird und dort das gefloخته Konstrukt rekombiniert. Um eine möglichst große Chance auf leberspezifische Onkogenexpression zu erzielen wurde das cre-ER^{T2} Fusionsgen wie die gefloخته Tag-Sequenz unter die Kontrolle des Albumin-Promotors gesetzt. Für diesen Ansatz müssen die gefloخته Maus (AST oder ATI) und Alb-cre-ER^{T2}-Maus miteinander zu doppeltransgenen Mäusen gekreuzt und anschließend mit 4-OH-Tamoxifen behandelt werden.

Um Cre schneller und unkomplizierter in AST oder ATI-Tiere einzubringen soll eine zweite Methode zur Anwendung kommen. Gefloخته Tiere sollen mit Liposomen, die ein cre-kodierendes Plasmid enthalten, intravenös injiziert werden. Ein geringer Teil der Hepatozyten sollte die Genföhre aufnehmen und Cre exprimieren. Im Folgenden wird die Herstellung der Alb-creER^{T2} transgenen Tiere und erste Versuche mit Liposomen als Genföhren beschrieben.

2.1. Alb-creER^{T2} transgene Maus

Herstellung des Alb-creER^{T2}-Konstrukts

Aus pcreER^{T2} (Feil *et al.*, 1997) wurde über Bgl I / Sal I-Doppelverdau ein 2,9kb großes Fragment (enthält β -Globin-Intron II vom Kaninchen, kodierende Sequenz für das Fusionsprotein aus cre-Rekombinase und der Ligandbindedomäne der Östrogen-Rezeptor-Mutante T2 sowie SV40-Polyadenylierungssignal) entnommen und nach Auffüllen der Enden in die XbaI-Schnittstelle 3' vom Albumin-Promotor/Enhancer in pUC19-Alb-P/E über stumpfe Enden eingesetzt. Das Intron soll die Effizienz der Genexpression erhöhen (Clark *et al.*, 1993). Das fertige Konstrukt (Abb. 33) wurde durch SphI/KpnI-Doppelverdau freigesetzt, aufgereinigt und mikroinjiziert.

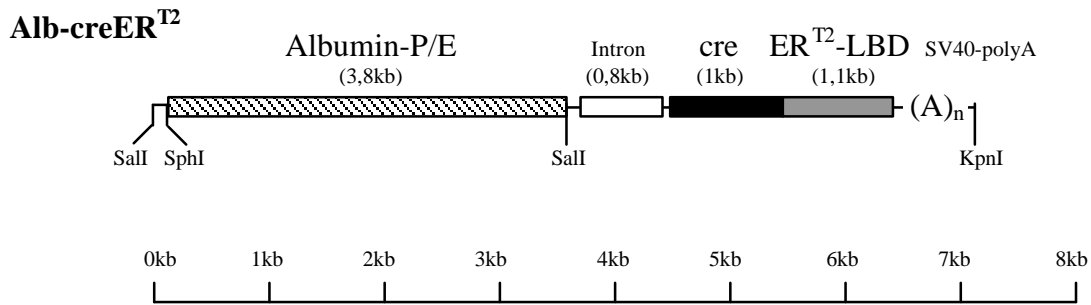


Abb. 33 : Genskizze des injizierten Alb-creER^{T2} DNA-Konstrukts.

Abkürzungen : ER^{T2}-LBD = Trippelmutante der Ligandbindedomäne des Östrogenrezeptors; Albumin-P/E = Albumin-Promotor/Enhancer; SV40-polyA = SV40 Polyadenylierungsstelle.

Es konnten 6 Gründertiere identifiziert werden, von denen 5 das Transgen an die Nachkommen weitergaben. Von diesen verbleibenden 5 Linien exprimieren nur zwei die mRNA für das creER^{T2}-Fusionsprotein. Linie 2 weist ein starkes und Linie 6 ein schwaches Signal auf (Abb. 34). Diese Tiere wurden mit Reportermäusen verpaart, die nach Rekombination das fluoreszierende Molekül EGFP (enhanced green fluorescent protein) herstellen, um die Analyse auf Induzierbarkeit mittels 4-Hydroxy-Tamoxifen (4OHT) zu erleichtert. Das Ergebnis der Induktion mit 4OHT konnte bis zum Abschluß der Arbeit nicht fertiggestellt werden und wird mit Spannung erwartet.

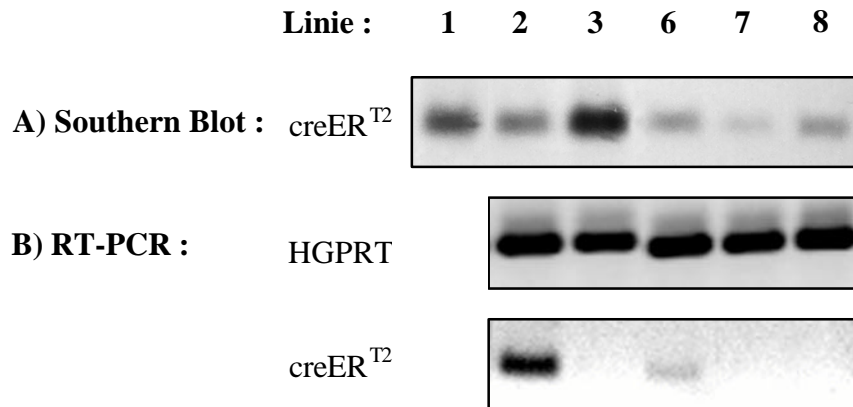


Abb. 34 : Nachweis des Transgens und dessen Expression in verschiedenen Alb-creER^{T2} transgenen Linien.

A) Southern Blot auf Eco471-verdaute Schwanz-DNA, hybridisiert mit cre-spezifischer Sonde. B) RT-PCR auf Leber-cDNA mit HGPRT- und creER^{T2} spezifischen Primerpaaren. Linie 1 hat das Transgen nicht weitervererbt, so daß keine weitere Analyse dieser Linie möglich war.

2.2. Alb-cre Liposomen

Herstellung des Alb-cre-Plasmids für Liposomenexperimente

Im Unterschied zu den DNA-Konstrukten für die transgenen Mauslinien wurde hier eine Kernlokalisationssequenz (NLS) an den Anfang des cre-Gens gestellt, um den Transfer von Cre in den Nukleus effizienter zu machen. Aus pHD2-NLScre1 (von Christoph

Kellendonk, DKFZ Heidelberg) wurde das NLScre1-enhaltende 1kb große Fragment über HindIII und KpnI ausgeschnitten und in die entsprechenden Stellen in pBS SKII⁺ eingefügt um es erneut über XbaI und KpnI freizusetzen und in die entsprechenden Schnittstellen 3' des Alb-Promotor/Enhancers gerichtet in pUC19-Alb-P/E einzusetzen.

pUC19-Alb-NLScre

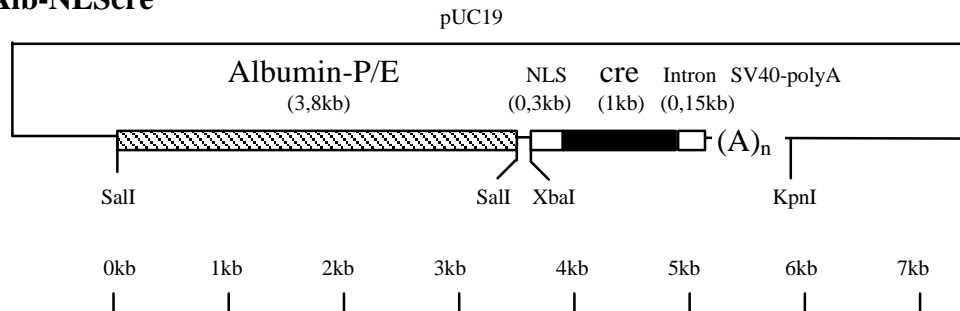


Abb. 35 : Genskizze des Alb-NLScre DNA-Konstrukts.

Abkürzungen : Albumin-P/E = Albumin-Promotor/Enhancer; Intron = Intron der SV40 frühen Region; NLS = Nukleus-Lokalisations-Sequenz; pUC19 = Sequenz des Klonierungsvektors; SV40-polyA = SV40 Polyadenylierungsstelle.

Herstellung der Liposomen

Das vollständige Protokoll zur Herstellung von Liposomen ist im Methodenteil beschrieben. Hier soll nur ein kurzer Abriss des verwendeten Protokolls gegeben werden. Ethergelöste Lipide (Cholesterol, Phosphatidylserin, Phosphatidylcholin) werden in einem definierten Verhältnis gemischt, das Lösungsmittel verdampft und das Lipidgemisch in Wasser mittels Ultraschall zu Liposomen suspendiert. Plasmid-DNA (Alb-creNLS1) wird zugegeben, das Gemisch schockgefroren, über Nacht lyophilisiert und mit HEPES wieder

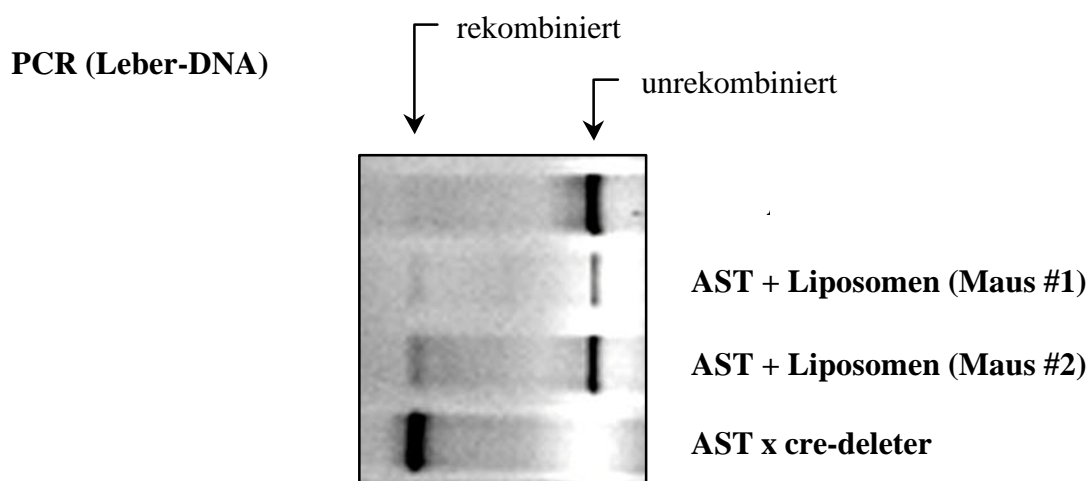


Abb. 36 : Partielle Deletion der floxstop-Kassette in Lebern von AST Tieren nach Injektion von Alb-cre DNA enthaltenden Liposomen.

Alb-cre Liposomen wurden wie im Methodenteil beschrieben hergestellt und intravenös in 2 Tiere der AST-Linie 60 injiziert. Nach 8 Tagen wurden die Lebern der Tiere entnommen und die gewonnene DNA mittels PCR (floxstop-del-Tag-Primerpaar) auf Rekombination der floxstop-Kassette analysiert.

aufgenommen. Diese De- und Rehydratation führt zu einer Verpackung eines Teils der DNA in die Liposomen. Da in den weiteren Schritten des Protokolls nur eine weitere Aufreinigung bestimmter Subpopulationen von Liposomen stattfindet wurde an diesem Schritt abgebrochen und die generierten Liposomen in einem Volumen von 200µl (enthält 10µg DNA) in die Schwanzvene von geflochten Tieren injiziert. Da es sich um erste orientierende Experimente handelte, wurden hierfür Tiere der AST₆₀-Linie eingesetzt, deren transgenes Konstrukt rekombiniert werden kann, allerdings ohne Tumorbildung zu induzieren. Rekombination sollte auf DNA-Ebene mit Hilfe von PCR nach der Liposomen-Applikation getestet werden. Abbildung 36 stellt das Ergebnis der PCR dar. Alb-creNLS1-Liposomen-Applikation führt in 2 AST-Tieren zu einer geringen Rekombination des geflochten Konstrukts in der Leber. Beim Großteil der Transgene findet keine Deletion der Stop-Kassette statt, was durch die unrekombinierte Bande angezeigt wird. Ob dieser (erwartet und beabsichtigte) geringe Anteil an Rekombination auch zu Tumorbildung führt soll in den etablierten rekombinierten ATI₁-Mäusen getestet werden.

3. Zusammenfassung des zweiten Teils :

Etablierung eines induzierbaren autochthonen Lebertumormodells in der Maus.

Für die Generierung eines induzierbaren autochthonen Tumormodells haben wir das cre/loxP-System eingesetzt. Hierbei rekombiniert Cre-Rekombinase loxP-flankierte (gefloxt) DNA-Sequenzen und induziert die Expression des SV40 großen Tumor-Antigens (Tag). Über die Verwendung des Albumin-Promotors wird die Transformation auf Lebergewebe eingeschränkt.

1. *Cre-vermittelte Deletion einer DNA-Sequenz, die Expression des Tag-Transgens verhindert, führt in 5 transgenen Linien nur unzuverlässig zu Transgen-Expression und Tumorentwicklung in der Leber. Die Linien wurden nicht weiterverfolgt.*
2. *Cre-vermittelte Inversion einer invertierten Tag-Sequenz induziert in 2 transgenen Linien die Entstehung von multifokalen Hepatozellulären Karzinomen innerhalb von 6 Monaten.*
3. *Transformation findet ausschließlich in Hepatozyten statt. Es gibt kein Anzeichen von Metastasierung des Hepatozellulären Karzinoms in andere Organe.*
4. *Onkogen-Expression ohne Rekombination konnte durch Reduktion der Transgenzahl auf eine Kopie eliminiert werden.*
5. *Intravenöse Applikation von Liposomen, die ein cre-kodierendes Plasmid tragen, führt zu partieller Rekombination eines gefloxtten Konstrukts in der Leber.*
6. *2 transgene Linien, die ein Steroid-induzierbares Fusionsprotein aus Cre und der Ligandbindedomäne des Östrogenrezeptors exprimieren, konnten generiert werden.*

V. Diskussion

In dieser Arbeit sollte die Bedeutung von Entzündungsreaktionen auf die Immunantwort von T-Zellen gegen Selbst-Antigene auf *gesundem* und *malignem* Körpergewebe untersucht werden. Dazu diente ein Mausmodell, in dem das MHC Klasse I Molekül K^b auf Hepatopzyten und ein transgener K^b -spezifischer TZR auf einem Teil der T-Zellen exprimiert ist. Um in diesem Model Autoimmunität gegen Lebergewebe induzieren zu können bedarf es sowohl der Aktivierung K^b -spezifischer T-Zellen als auch einer Entzündungsreaktion der K^b -exprimierenden Leber, die durch eine bakterielle Infektion generiert wurde.

Im ersten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, daß

1. *eine Entzündungsreaktion in Abwesenheit struktureller Mimikry ausreichend ist, um aktivierten autoreaktiven T-Zellen Zugang in das Leberparenchym zu ermöglichen und Schaden zu verursachen.*
2. *eine anhaltende Entzündungsreaktion tolerante autoreaktive T-Zellen aktivieren und eine Autoimmunreaktion auslösen kann.*

Im zweiten Teil sollte ein Tumormodel in der Maus geschaffen werden, um die Rolle einer Inflammation bei der T-Zell-Antwort gegen Selbst-Antigene auf *malignem* Lebergewebe untersuchen zu können. Zu diesem Zweck wurde ein *induzierbares autochthones Lebertumormodel etabliert*.

A. Teil I : Die Rolle von Entzündungsreaktionen bei der Induktion von Autoimmunität gegen Lebergewebe

In Alb- $K^b \times$ DesTZR Tieren konnte eine Autoimmunreaktion gegen Lebergewebe in 2 Schritten induziert werden. Erster Schritt ist die Aktivierung K^b -spezifischer Des⁺ T-Zellen. Zweiter Schritt ist die Infektion der K^b -exprimierenden Leber mit dem Bakterium *Listeria monocytogenes*, das nach intravenöser Injektion vorwiegend Leber und Milz befällt. Um festzustellen, ob es sich bei dem induzierten Leberschaden um eine Reaktion gegen ein körpereigenes Peptid auf K^b (Autoimmunreaktion) oder um eine Reaktion gegen ein bakterielles Peptid auf K^b (antibakterielle Immunreaktion, molekulare Mimikry) handelt, wurde die bakterielle Infektion durch eine proinflammatorische Substanz ersetzt.

1. CpG-ODN ermöglicht aktivierten T-Zellen Lebergewebe antigenspezifisch zu schädigen : unabhängig von molekularer Mimikry.

Als proinflammatorische Substanz wurden Oligodeoxynukleotide eingesetzt, die ein unmethyliertes CpG-Dinukleotid in einer konservierten Hexanukleotid-Sequenz besitzen (CpG-ODN). Diese Sequenzen repräsentieren bakterielle DNA und führen in Mäusen hauptsächlich zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems. CpG-ODN binden direkt an professionelle Antigen-präsentierende Zellen und stimulieren diese zur Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und IL-12. Da 15% aller Zellen in der Leber sessile Makrophagen (Kupffersche Sternzellen) sind wird durch systemische Applikation von CpG-ODN eine Entzündungsreaktion in der Leber induziert, die in Infiltration mononukleärer Leukozyten in Leberparenchym resultiert (Branda *et al.*, 1993; McIntyre *et al.*, 1993; Zhao *et al.*, 1996).

Um zu klären, ob CpG-ODN in der Lage ist, eine Listerien-Infektion in der Leber zu ersetzen und somit molekulare Mimikry als Mechanismus des immunogenen Schadens der Leber auszuschließen wurde folgendes System gewählt. Milzzellen einer Maus, die α - und β -Kette des K^b-spezifischen TZR als Transgene exprimieren (DesTZR) wurden *in vitro* gegen K^b stimuliert und anschließend in Rezipienten adoptiv transferiert, die K^b unter dem Promotor des C-reaktiven Proteins (CRP-K^b) oder dem Albumin-Promotor (Alb-K^b) ausschließlich in der Leber exprimieren und mit CpG-ODN vorbehandelt waren.

Es konnte gezeigt werden, daß Rezipienten, die K^b auf Hepatozyten exprimieren (CRP-K^b und Alb-K^b) nach Transfer und CpG-ODN-Behandlung einen Leberschaden (200-250 U/l ALT) aufweisen (Abb. 6). Der Schaden ist abhängig von 3 Faktoren. *Erstens* vom Transfer aktivierter DesT-Zellen, was beweist, daß es sich um einen T-Zell vermittelten autoimmunen Schaden handelt. *Zweitens* von der Vorbehandlung der Rezipienten mit entzündungsfördernden CpG-ODN (1826 oder 1668). Die Tatsache, daß ODN 1720 zu keinem Leberschaden nach Transfer führt, zeigt, daß die Anwesenheit des immunstimulatorischen CpG-Motifs notwendig ist. *Drittens* ist der Leberschaden abhängig von der Anwesenheit von K^b auf Hepatozyten, da in Ker-K^b Rezipienten, die K^b auf Keratinozyten der Haut tragen, kein signifikanter Leberschaden meßbar ist. Dadurch kann auch ein toxischer Leberschaden durch CpG-ODN ausgeschlossen werden. Die CpG-ODN vermittelte Wirkung ermöglicht somit transferierten Des⁺ Effektor-T-Zellen Lebergewebe antigenspezifisch zu schädigen.

Diese Ergebnisse zeigen, daß für den T-Zell vermittelten Leberschaden die Anwesenheit eines bakteriellen Peptids auf K^b der Leber nicht notwendig ist, was bei der vorangegangenen Verwendung einer Listerieninfektion nicht ausgeschlossen werden konnte. Somit handelt es sich bei dem Leberschaden um eine Autoimmunreaktion und nicht um eine antibakterielle Immunreaktion, die auf struktureller Ähnlichkeit von Selbst- und Fremd-Epitop (molekulare Mimikry) beruhen würde.

2. In vivo Effekt von CpG-ODN auf die Effektorphase von T-Zellen

2.1. Konditionierung von Lebergewebe

In unserem System konnte gezeigt werden, daß aktivierte T-Zellen nur dann Zugang zum Leberparenchym haben und autoimmunen Schaden verursachen, wenn die Rezipienten vor Transfer mit CpG-ODN behandelt wurden. Die Behandlung führte zur Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1 auf Endothelzellen der Lebersinusoiden (LSEC), Kupffer Zellen (KC) und Hepatozyten in der Leber, was mit immunhistologischen Methoden nachgewiesen werden konnte (Abb. 11 und 12). CpG-ODN sind als starke Immunstimulantien *in vivo* beschrieben worden (Wagner, 1999) und führen zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-12 und anderen durch Dendritische Zellen, Makrophagen und NK-Zellen (Raz, 2000), die *in vivo* Adhäsionsmoleküle hochregulieren können. So induzieren TNF- α und IL-1 α ICAM-1 auf LSEC (Ohira *et al.*, 1994) und Kupffer Zellen (Grewe *et al.*, 1993). Die Migration von Leukozyten in Lebergewebe ist von der Anwesenheit von Adhäsionsmolekülen auf LSEC abhängig (Kolb-Bachofen *et al.*, 1984; Schlepper-Schafer *et al.*, 1986). Auch bei Patienten mit akuten und chronischen Leberentzündungen korreliert die Expression von ICAM-1, VCAM-1 und ELAM-1 mit der leukozytären Infiltration ins Leberparenchym (Gulubova *et al.*, 1998; Volpes *et al.*, 1992b). In unserem System sind die Liganden für ICAM-1 (LFA-1) und VCAM-1 (VLA-4) auf aktivierten DesT-Zellen exprimiert, was deren Migration ins Leberparenchym vermittelt (Limmer *et al.*, 1998).

ICAM-1 kann nicht nur auf LSEC und Kupffer Zellen sondern auch auf Hepatozyten hochreguliert werden. So führt die LPS-Gabe *in vivo* (van Oosten *et al.*, 1995) bzw. TNF- α , IL-1, IL-6 und IFN- γ *in vitro* (Sato *et al.*, 1994; Morita *et al.*, 1994; Kvale *et al.*, 1993; Thomson *et al.*, 1994) zu erhöhter Expression von ICAM-1 auf Hepatozyten. Dies ermöglicht ein „Festhalten“ („Trapping“) der aktivierten T-Zellen im Leberparenchym, was die Effektorphase unterstützen könnte..

Die Notwendigkeit einer Konditionierung für die Infiltration von T-Zellen in die Leber scheint mit Ergebnissen anderer Gruppen im Widerspruch zu stehen. Diese berufen sich darauf, daß Hepatozyten zwar durch lebersinusoidale Endothelzellen (LSEC) und dem Disseschen Raum vom Lumen der sinusoidalen Blutgefäße getrennt sind, das Leberendothel aber eine Basalmembran fehlt und 10% der gesamten Fläche des Endothels mit ca. 100nm großen Löchern fenestriert ist, die teilweise zu 300-500nm großen Siebfeldern zusammengefaßt sind (Wisse, 1970 und 1985). Dies soll den direkten Zugang für naive (Luettig *et al.*, 1999) und aktivierte (Mehal *et al.*, 1999) T-Zellen ins Leberparenchym ermöglichen, ohne das eine Aktivierung des sinusoidalen Endothels der Leber notwendig ist. Eine signifikante Infiltration von T-Zellen in das Leberparenchym scheint jedoch unwahrscheinlich, da der Durchmesser von Lymphozyten zwischen 2 und 5 µm beträgt und T-Zellen damit die 100nm kleinen Fenestrae im Endothel nicht passieren können.

Außerdem, gibt es in Systemen, die scheinbar keine Entzündung für die Entstehung einer Autoaggression benötigen, Hinweise auf Konditionierung des Lebergewebes. So führt der Transfer aktivierter CD8⁺ T-Zellen, die für ein Epitop des Oberflächenantigens des Hepatitis B Virus (HBsAg) spezifisch sind, in transgene Tiere, die HBsAg auf Hepatozyten exprimieren direkt zur Infiltration und Schädigung der Hepatozyten (Ando *et al.*, 1993). Im Unterschied zu unserem System handelt es sich aber bei HBsAg um ein lösliches Antigen, das durch Kreuzpräsentation auch von Kupffer Zellen und LSEC CD8 T Zellen präsentiert werden könnte. Da der transferierte CD8⁺ T Zell Klon außerdem große Mengen IFN-γ sezerniert, das antigenpräsentierende Kupfferzellen und LSEC zur Sekretion weiterer proinflammatorischer Zytokine stimulieren kann, ist es wahrscheinlich, daß auch in diesem System eine Konditionierung von Lebergewebes induziert wurde.

Ein zweites Modell bei dem scheinbar keine Konditionierung notwendig ist, um aktivierten CD8⁺ T-Zellen weist Parallelen zum eben genannten System auf. Mäuse, die transgen das Glykoprotein des LCMVirus (LCMV-GP) in der Leber exprimieren (Alb1) und mit naiven GP-spezifischen transgenen CD8-T-Zellen adoptiv transferiert werden, erkranken nach LCMV-Infektion an einer transienten Hepatitis (Voehringer *et al.*, 2000). Auch hier handelt es sich um ein lösliches Antigen, das durch LSEC und KZ präsentiert werden kann. Eine LCMV-Infektion kann nicht nur T-Zellen stimulieren, sondern infiziert auch Hepatozyten, was bei hohem applizierten Virustiter zu Hepatitis führt (Zinkernagel *et al.*, 1986) und auf diesem Weg die Leber konditioniert. Voehringer *et al.* zeigten ebenfalls, daß auch der Transfer von *in vivo* über eine LCMV-Infektion aktivierten GP-spezifischen T-Zellen in Alb1-Tiere eine transiente Hepatitis entsteht. Hierbei kann eine Kontamination von

transferierten T-Zellen mit LCMV nicht vollständig ausgeschlossen werden, was eine Entzündung in der Leber induzieren könnte.

Somit spielt wahrscheinlich auch in anderen autoimmunen Systemen der Leber eine Entzündungsreaktion eine entscheidende Rolle in der Entstehung eines T-Zell vermittelten Leberschadens.

2.2. Konditionierung der autoreaktiven T-Zellen.

Neben der Konditionierung von Lebergewebe kann CpG-ODN auch auf den Aktivitätsstatus der DesT-Zellen Einfluß nehmen. So führt Peptid- oder Proteinvakzinierung mit CpG-ODN als Adjuvanz *in vivo* zu starken Th1-Antworten (Carson und Raz; Klinman et al.; Roman *et al.*, alle 1997) selbst bei präexistierender Th2-Antwort. Th1 Antworten sind in erster Linie auf die Sekretion von IL-12 zurückzuführen. Neben der Induktion führt IL-12 auch zur Aufrechterhaltung einer Th1-Antwort. Dieser extrinsische Effekt von CpG-ODN führt vermutlich auch zur Proliferation von CD8 Gedächtniszellen Peritoneum, nach intraperitonealer CpG-ODN-Injektion (Zhang *et al.*, 1998). Eine intrinsische Wirkung auf T-Zellen, daß heißt ein direkter Effekt, spielt vermutlich keine Rolle. *In vitro* Arbeiten haben gezeigt, daß CpG-ODN nur einen schwach kostimulatorischen Effekt auf T-Zellen ausüben, die gleichzeitig mit immobilisierten α -CD3-Antikörpern inkubiert wurden (Sun *et al.*, 1996; Bendigs *et al.*, 1999; Lipford *et al.*, 2000).

Den Einfluß von proinflammatorischen Zytokinen auf die Aktivität von T-Zellen konnte in einem Transfersystem gezeigt werden. Lymphknotenzellen aus Mäusen, die mit PLP *in vivo* stimuliert wurden, führten nach Restimulation mit PLP und IL-12 und adoptiven Transfer in Rezipienten zu einer stärkeren und längeranhaltenden EAE als Lymphknotenzellen, die nur mit PLP stimuliert wurden (Leonard *et al.*, 1995).

2.3. CpG-ODN beeinflusst Effektormechanismen.

Die Freisetzung von Alanin-Aminotransferase aus Hepatozyten, der wichtigste Parameter für Leberschaden in der vorliegenden Arbeit, kann auf verschiedenen Mechanismen beruhen. CpG-ODN haben keinen direkten toxischen Effekt auf Hepatozyten. Die einzige toxische Wirkung von CpG-ODN liegt in der Bindung von Plasmaproteinen, was zu einer Verlängerung der Gerinnungszeiten (Henry *et al.*, 1997a) und nur bei Affen zu Komplementaktivierung führt (Galbraith *et al.*, 1994; Henry *et al.*, 1997b). Somit muß die Schädigung der Hepatozyten auf Des⁺ T-Zellen selbst und/oder auf CpG-ODN-induzierte Effekte des Immunsystems zurückgehen.

Hepatozyten exprimieren konstitutiv CD95 in recht hoher Dichte auf der Zelloberfläche und können somit Des⁺ T-Zellen als Zielstruktur dienen. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß ODN Behandlung die Expression von CD95 noch weiter erhöht (Abb. 16) und die Zellen dadurch empfindlicher gegenüber T-Zell-vermittelter Lyse gemacht werden. Einen ähnlichen Effekt wie CpG-ODN bei uns hat die transgene Expression von IFN- γ im NOD-Modell, das zur Induktion von CD95 auf β -Zellen führt. *lpr/lpr* NOD-Mäuse entwickeln keine Diabetes mehr (Chervonsky *et al.*, 1997).

CD95 konnte auch in verschiedenen Hepatitis-Systemen als wichtiger Effektormechanismus nachgewiesen werden. So führt die intraperitoneale Applikation von agonistischem α -CD95-Antikörpern zu fulminanter Hepatitis und schnellem Tod der Versuchstiere (Ogasawara *et al.*, 1993). In einem anderen Model konnte durch die Applikation von löslichem CD95 die Induktion von Hepatitis durch Transfer eines HBsAg-spezifischen CD8⁺ T-Zell-Klons in HBsAg transgene Mäuse unterdrückt werden (Kondo *et al.*, 1997). In der gleichen Arbeit wurde gezeigt, daß sich über die Injektion von LPS/Propionibakterien in *lpr*-Mäusen, die ein defektes CD95-Gen tragen, keine Hepatitis mehr auslösen läßt.

Neben CD95 konnte in einigen Systemen auch Perforin als Effektormolekül der Leberschädigung identifiziert werden. Perforin- und nicht CD95-defiziente Tiere weisen nach Injektion von *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A verringerte ALT-Freisetzung auf (Schümann *et al.*, 1998). Effektormolekül ist dann vermutlich Granzym, das Apoptose durch intrazelluläre Aktivierung von Kaspasen in Gang setzt. In LCMV-GP-Tieren auf dem Perforin-„knockout“ Hintergrund ist zwar Infiltration aber kein Schaden der β -Zellen des Pankreas erkennbar (Kägi *et al.*, 1994).

Neben der Lyse der Hepatozyten durch T-Zellen mittels CD95 oder Perforin können auch Makrophagen Lebergewebe direkt schädigen. Hepatozyten exprimieren TNF-Rezeptor und könnten über membranständiges oder sezerniertes TNF- α von Kupffer-Zellen zu einem geringen Prozentsatz in die Apoptose getrieben werden (Leist *et al.*, 1995; Grell *et al.*, 1995). Dies führt vermutlich auch zu dem geringen Leberschaden nach CpG-ODN Applikation in Abwesenheit transferierter Des⁺ T-Zellen in unserem System, da Makrophagen unspezifisch stimuliert werden. Für die vollständige Aktivierung der zytolytischen Aktivität von Makrophagen sind jedoch CD8⁺ T-Zellen notwendig (Gantner *et al.*, 1996). Dies konnte in zwei Systemen gezeigt werden, in denen über die Injektion von Concanavalin A (Chisari und Ferrari, 1995; Küsters *et al.*, 1997) bzw. *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin-A (Schümann *et al.*, 1998) eine Hepatitis induziert wird, die von der TNF- α Sekretion durch Makrophagen

abhängig ist. Die Depletion von T-Zellen oder die Verwendung von T-Zell-defizienten Nacktmäusen führt zu einem Ausbleiben von TNF- α induzierter Hepatitis durch Makrophagen. IFN- γ von T-Zellen war notwendig, um Makrophagen zu Gewebeschädigung zu stimulieren.

In unserem System zeigen CpG-ODN-behandelte Tiere eine starke Zunahme von MHC Klasse II-positiven Zellen und entzündliche Infiltrate im Leberparenchym, die mit großer Wahrscheinlichkeit Makrophagen beinhalten und somit als Effektorzellen für Des⁺ T-Zellen dienen könnten.

Als dritte Population neben T-Zellen und Makrophagen kommen NK-T-Zellen für die Verursachung des Leberschadens in Frage. Diese Möglichkeit beruht auf der Tatsache, daß die Anwesenheit des K^b-Antigens auf Hepatozyten zu einer selektiven Anreicherung von K^b-spezifischen-T-Zellen in der Leber führt, die NK1.1 exprimieren, (Legendre *et al.*, 1999). NK1.1 ist charakteristisch für NK-Zellen, die nach Stimulation große Mengen proinflammatorischer Zytokine in kurzer Zeit freisetzen können und somit einen Beitrag zur Konditionierung und/oder Schädigung von Lebergewebe leisten können. Es handelt sich in diesem Fall zwar nicht um die von uns verwendete K^b-spezifische TZR-Linie, eine ähnliche positive Selektion auf leberspezifisch-exprimiertes K^b könnte jedoch auch in unserem Fall möglich sein. Legendre *et al.* zeigten ebenfalls, daß TZR-einzeltransgene Tiere, die kein K^b exprimieren, keine ausgeprägte K^b-spezifische NK-T-Zellpopulation besitzen, weder in der Leber noch in der Milz. Der autoimmune Leberschaden, den wir nach adoptivem Transfer von aktivierten Milzzellen aus TZR-Tieren in CRP-K^b-Rezipienten beobachtet haben, ist deswegen vermutlich unabhängig von diesen Zellen.

Die Effektorzellen beim Transfer aktivierter Des-T-Zellen in CpG-ODN-behandelte CRP-K^b-Rezipienten sind wahrscheinlich die K^b-spezifischen T-Zellen selbst, oder die von ihnen aktivierten Makrophagen. In doppeltransgenen DesTZRxCRP-K^b-Tieren, die mit CpG-ODN behandelt wurden, können außerdem NK-T-Zellen eine Rolle bei der Autoaggression spielen.

3. IL-12 als entscheidender Faktor der CpG-ODN-Wirkung

Die Applikation von IL-12-depletierenden Antikörpern zusammen mit CpG-ODN reduziert in unserem System den Leberschaden nach Transfer aktivierter T-Zellen deutlich (Abb. 7). IL-12 spielt somit eine zentrale Rolle im CpG-ODN vermittelten Effekt.

IL-12 ist ein Heterodimer, das aus einer p35 und einer p40 Untereinheit besteht und deswegen auch als IL-12 p75 bezeichnet wird (Lamont *et al.*, 1996). IL-12 wird vorwiegend

von Makrophagen aber auch von Dendritischen Zellen und Neutrophilen nach Aktivierung durch bakterielle Produkte produziert (Trinchieri, 1995) und bindet an den IL-12 Rezeptor (IL-12R) auf B-, NK- und aktivierten T-Zellen (Lamont *et al.*, 1996). Die beiden Untereinheiten des IL-12R, $\beta 1$ und $\beta 2$, können jede für sich IL-12 mit geringer Affinität binden, oder als Heterodimer einen hochaffinen Rezeptor ausbilden. Th2 Zellen exprimieren nur die $\beta 1$ Kette, Th1 Zellen exprimieren beide Untereinheiten. Diese unterschiedliche IL-12R-Expression reflektiert die entscheidende Bedeutung von IL-12 in der Induktion und Aufrechterhaltung von Th1 Immunantworten (Seder *et al.*, 1993; Manetti *et al.*, 1993; Magram *et al.*, 1996).

IL-12 ist auch an der Entstehung von Autoimmunerkrankungen beteiligt (Trembleau *et al.*, 1995a; Segal und Shevach, 1996; Caspi, 1998). So führt der Transfer von Lymphknotenzellen, die *in vitro* mit PLP stimuliert wurden, in IL-12 behandelten Rezipienten zu einer schwereren und längeranhaltenden EAE als in Tieren ohne IL-12 Applikation (Leonard *et al.*, 1995 und 1997). Im gleichen System konnte durch die Applikation von IL-12-neutralisierenden Antikörpern in Rezipienten von PLP-aktivierten Lymphknotenzellen die Inzidenz und Schwere der EAE stark reduziert werden. Auch IDDM und CIA können in experimentellen Systemen durch IL-12 induziert oder verstärkt werden. So führt die Injektion von IL-12 in NOD Weibchen zu einer Erhöhung der IDDM-Inzidenz von 60% auf 100% (Trembleau *et al.*, 1995b). Umgekehrt führt die Behandlung mit IL-12 Antagonisten zu einem Ausbleiben von IDDM in NOD-Tieren (Rothe *et al.*, 1997; Trembleau *et al.*, 1997) und zur Inhibierung von spontanen Rückfällen bei Suppeantigen-induzierter EAE (Constantinescu *et al.*, 1998). Inzidenz und Schwere von CIA sind in IL-12-defizienten Mäusen reduziert (McIntyre *et al.*, 1996). In beiden Systemen (EAE, IDDM) wird IL-12 vorwiegend als Th1-Stimulanz diskutiert, das die Aktivität von Th1 Zellen verstärkt. Gemäß den Ergebnissen in unserem System besteht die Möglichkeit, daß IL-12 außerdem für die Konditionierung der Zielgewebe (Pankreas, Zentrales Nervensystem) über die Stimulation des angeborenen Immunsystems verantwortlich ist, was den Zugang für aktivierte T-Zellen erleichtern würde.

Die Wirkung von IL-12 auf die Leber wurde von Myers *et al.* detailliert untersucht (Myers *et al.*, 1998). Die Verabreichung großer Mengen IL-12 über einen Zeitraum von fünf Tagen induziert Leberentzündung, Proliferation und Hypertrophie von Kupffer-Zellen, Hepatozyten-Nekrose, multifokale Akkumulation von Leukozyten im Leberparenchym, sowie um den Portaltrakt und um die Zentralvenen. Die Infiltration besteht primär aus mononukleären Leukozyten, die LFA-1, VLA-4, MAC-1 und CD18 exprimieren (Myers *et al.*, 1998).

Diese Effekte sind vermutlich auf die Wirkung von IL-12 auf Th1 und NK-Zellen zurückzuführen, die über IFN- γ Ausschüttung Kupffersche Sternzellen zu TNF- α -Sekretion stimulieren. TNF- α wie IFN- γ zeigen in verschiedenen Systemen eine Induktion oder Verstärkung von Autoimmunreaktionen. Die Abhängigkeit der IL-12 vermittelten Effekte von IFN- γ zeigt sich auch in der IL-12 defizienten Maus (Magrath *et al.*, vor 1996), deren auffälligster Defekt neben einer gestörten Th1-Antwort, die IL-12 abhängige IFN- γ Sekretion durch NK-Zellen ist. Außerdem verstärkt die Behandlung mit IL-12 in einer IFN- γ abhängigen Weise die Autoimmunreaktion von DBA/1-Mäusen gegenüber Kollagen Typ II und verursacht so eine schwere Form der Arthritis (Germann *et al.*, 1995). Die Funktion von IFN- γ in Autoimmunreaktionen wird deutlich in einem Mausystem, in dem LCMV-GP in den β -Zellen des Pankreas exprimiert wird. Diese Tiere entwickeln nach LCMV-Infektion Diabetes. Besitzen RIP-GP-Tiere jedoch kein funktionelles IFN- γ ist nach Infektion keine Diabetes nachweisbar, was mit einer fehlenden MHC Klasse II Expression und Infiltration von Immunzellen in den Pankreas korreliert (von Herrath und Oldstone, 1996). IFN γ induziert auch MHC-KlasseI-Moleküle auf β -Zellen des Pankreas und macht die Zielzellen empfindlicher gegenüber Lyse (Campbell *et al.*, 1985 und 1988). Auch die Expression eines IFN- γ Transgens im Zentralen Nervensystem führt zu Infiltration und Hochregulierung von MHC Klasse I und II Molekülen und EAE (Horwitz *et al.*, 1997). IFN- γ spielt auch in der Leber eine entscheidende Rolle. So führt die Behandlung von IFN- γ defizienten Tieren mit Concanavalin A nicht zu Hepatitis (Tagawa *et al.*, 1997) und umgekehrt die transgene Expression von IFN- γ in der Leber zu chronischer Hepatitis und zum Tod (Toyonaga *et al.*, 1994).

CpG-ODN sind auch in anderen Autoimmunitätsmodellen zum Einsatz gekommen. Einerseits sind sie als Adjuvanz zusammen mit gewebespezifischen Antigenen eingesetzt worden. So konnte EAE in Versuchstieren durch die Injektion von CpG-ODN mit Myelin Basischem Protein induziert werden (Segal *et al.*, 2000). Andererseits ermöglichten sie die Induktion von T-Zell-unabhängigen autoaggressiven Immunreaktionen. So konnte durch die lokale Injektion von CpG-ODN in das Kniegelenk von Mäusen Arthritis ausgelöst werden, die auf der Rekrutierung und Aktivierung von Makrophagen beruht (Deng *et al.*, 1999).

4. CpG-ODN und Aktivierung K^b-spezifischer T-Zellen.

Die Induktion einer Autoimmunreaktion gegen Lebergewebe konnte nicht nur in einem adoptiven Transfer-System gezeigt werden, sondern auch in Tieren, die neben dem K^b

Molekül in der Leber auch den transgenen K^b -spezifischen TZR als Transgen exprimieren (10B). In diesen doppeltransgenen CRP- K^b DesTZR-Tieren kann nach vier CpG-ODN-Injektionen innerhalb von sechs Tagen ein signifikanter Leberschaden (380 U/l ALT) gemessen werden, der den Schaden in gleichbehandelten Ker- K^b x DesTZR um den Faktor 2 übersteigt und somit zu einem entscheidenden Teil antigenspezifisch ist. Dieser Schaden ist außerdem vom transgenen TZR-Repertoire abhängig, da CRP- K^b -Tiere und DesTZR-depletierte CRP- K^b DesTZR-Tiere einen deutlich geringeren Schaden aufweisen. Des⁺ T-Zellen scheinen nach CpG-ODN-Gabe *in vivo* aktiviert worden zu sein um anschließend autoaggressiv zu werden. In dieser Situation ermöglicht CpG-ODN nicht nur die Konditionierung des Zielgewebes, sondern auch die Stimulation der antigenspezifischen T-Zellen.

CRP- K^b transgene Tiere exprimieren K^b ausschließlich auf Hepatozyten und weder im Thymus noch auf Knochenmarks-abstammenden Zellen (Ferber *et al.*, 1994). In dieser Arbeit wurde auch ausgeschlossen, daß K^b von Hepatozyten auf Knochenmarks-abstammende Zellen wandert und Toleranz gegenüber K^b -tragenden Hauttransplantaten induzieren kann. Da für die Aktivierung von T-Zellen eine höhere K^b Dichte auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen notwendig ist als für eine Tolerisierung, kommen für eine K^b -spezifische Aktivierung von Des⁺ T-Zellen in CRP- K^b -Tieren nur Hepatozyten in Frage. Hepatozyten exprimieren in unserem System nach CpG-ODN-Applikation sowohl Adhäsionsmoleküle (VCAM, ICAM) als auch kostimulatorische Moleküle (B7.1, B7.2, CD40) (Abb. 16). Da ebenfalls K^b über die Induktion des CRP-Promotors hochreguliert wird scheinen Hepatozyten die Funktion von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen übernehmen zu können (Volpes *et al.*, 1992a). Ähnliche Ergebnisse haben auch Bertolino *et al.* *in vitro* erhalten (Bertolino *et al.*, 1998). Unbehandelte Hepatozyten von C57BL/6-Tieren (H-2^b) stimulieren Des⁺T-Zellen antigenspezifisch zu Proliferation und Zytotoxizität, was teilweise von der Interaktion zwischen ICAM-1 und LFA-1 abhängig ist. Allerdings sterben die Hepatozyten-aktivierten Des⁺ T-Zellen vorzeitig (unabhängig von TNFR und CD95). Durch exogene Gabe von IL-2 oder α -CD28-Antikörpern werden über die Induktion der antiapoptotischen Proteine bcl-x_L und bcl-2 der verfrühte Zelltod verhindert (Bertolino *et al.*, 1999). IL-2 oder α -CD28-Antikörpern führen in Des⁺ CD8 T-Zellen außerdem zu uneingeschränkter Sekretion von IL-2, IFN- γ und TNF- α sowie anhaltender Proliferation und zytotoxischer Aktivität. Diese *in vitro* Ergebnisse zeigen, daß kostimulatorische Moleküle wie B7 und Adhäsionsmoleküle Hepatozyten dazu befähigen K^b -spezifische T-Zellen vollständig und nachhaltig zu aktivieren – eine Gegebenheit, die wir *in vivo* nach CpG-ODN-Injektion vorfinden.

Diese Aussage, daß T-Zellen auf nicht-lymphoiden Zellen stimuliert werden können, steht im starken Kontrast zu der gängigen Meinung, daß naive T-Zellen ausschließlich in peripheren lymphatischen Organen, wie Milz und Lymphknoten, vollständig aktiviert werden können. Ursache dieser Theorie sind Studien von Frey und Wenk (1957) sowie Barker und Billingham (1967). Diese Gruppen trennten bei Meerschweinchen kleine Hautstücke so ab, daß sie nur noch über Arterien oder Venen mit dem Tier verbunden waren. Nur wenn drainierende (afferente) Lymphgefäße und Lymphknoten intakt blieben, konnte eine systemische Sensibilisierung gegen Antigene oder allogene Hauttransplantate erreicht werden, die auf das Hautstück aufgetragen wurden. Für die Induktion einer Zweitreaktion gegen das gleiche Antigen war das Lymphsystem nicht notwendig. Ob wir wirklich die Beteiligung von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen in unserem System ausschließen können, soll in zukünftigen Experimenten noch eingehender untersucht werden.

Daß neben der antigenspezifischen Stimulation durch CpG-ODN-stimulierte Hepatozyten Des^+ -T-Zellen möglicherweise auch antigenunspezifisch durch CpG-ODN aktiviert werden können (Sun *et al.*, 2000) scheint eher unwahrscheinlich. Eine direkte Aktivierung von isolierten T-Zellen in Abwesenheit eines Antigens ist durch CpG-ODN nicht und Kostimulation nur begrenzt möglich (Bendigs *et al.*, 1999; Lipford *et al.*, 2000). Neben den eher schwachen *intrinsischen* Effekten von CpG-ODN, besteht die Möglichkeit, *in vivo* über die Induktion von proinflammatorischen Zytokinen durch Makrophagen, DZ, B- und NK-Zellen einen stärkeren *extrinsischen* Einfluß auf T-Zellen auszuüben. Subkutane Applikation von CpG-ODN führt auf naiven ($\text{CD44}^{\text{niedrig}}$) CD4 und CD8 T-Zellen im drainierenden Lymphknoten zwar zur Hochregulierung von CD69, B7.2, MHC Klasse I und Ly6C, IL-2R β -Kette bleibt jedoch unverändert niedrig so daß auch keine Proliferation oder Zytotoxizität zu beobachten ist (Sun *et al.*, 1998b). Dieser Effekt ist von Typ-I-Interferonen (IFN- α/β) von DZ und Makrophagen abhängig. In einem zweiten System wurde CpG-ODN wie in unserem Fall intraperitoneal injiziert, was peritoneale Makrophagen zur Freisetzung von IL-15 und somit CD8 $^+$ Gedächtniszellen ($\text{CD44}^{\text{hoch}}$) über die Hochregulierung von IL2R β -Kette zu kurzfristiger Proliferation anregt (Zhang *et al.*, 1998). Die Fähigkeit dieser Zellen Zielzellen zu lysieren war jedoch nicht Gegenstand der Untersuchung. Somit gibt es zwar Hinweise auf die antigenunspezifische T-Zell-Aktivierung durch CpG-ODN aber sie lassen einen Beitrag an dem in unserem System beobachteten Leberschaden als fraglich erscheinen.

5. Die Autoimmunität ist vom transgenen TZR-Repertoire abhängig .

Die beobachtete Autaggression gegen Lebergewebe in CRP-K^b x DesTZR Tieren ist von der Anwesenheit des transgenen TZR-Repertoires abhängig. Erst die deutlich höhere Frequenz an K^b spezifischen T-Zellen macht einen Leberschaden von 390U/l ALT nach CpG-ODN-Behandlung möglich (Abb. 10B). Eine ähnliche Situation, wo zahlreiche T-Zellen eingeschränkter Spezifität unter physiologischen Bedingungen existieren sind Virusinfektionen. Bis zu 70% der aktivierten CD8⁺ T-Zellen in der Milz können während einer Infektion mit lymphozytären Choriomeningitis-Virus (LCMV) für ein einziges LCMV-Epitop spezifisch sein (Murali-Krishna et al., 1998).

Eine zweite Ursache für die Notwendigkeit des transgenen TZR könnte auf den oben schon genannten NKT-Zellen beruhen (Legendre *et al.*, 1999). NKT-Zellen können schon wenige Stunden nach Stimulation große Mengen IFN- γ und andere Th1-Zytokine freisetzen und so die lytische Aktivität von Des⁺ T-Zellen oder Makrophagen verstärken, als auch selbst zytolytisch werden (Bendelac *et al.*, 1997). Einen zusätzlichen Effekt auf die Konditionierung der Leber in Form von verstärkter Infiltration oder erhöhter Expression von Adhäsionsmolekülen konnte festgestellt werden, da CpG-ODN-behandelte CRP-K^b x DesTZR Tiere, deren Des⁺ T-Zellen depletiert wurden, eine geringere Expression von ICAM-1 und VCAM-1 oder MHC-Klasse II aufweisen als die CRP-K^b x DesTZR Gruppe, die nur mit CpG-ODN behandelt wurde. Der Beitrag von NKT-Zellen zu dem autoimmunen Schaden in unserem System soll durch Depletion dieser Zellen vor Beginn der CpG-ODN-Applikation in zukünftigen Versuchen geklärt werden.

Eine zweite offene Frage in Bezug auf das transgene TZR-Repertoire bleibt der verhältnismäßig hohe Leberschaden in CpG-ODN-behandelten Ker-K^b x DesTZR Tieren, der mit 200U/l ALT doppelt so hoch liegt, wie in der gleichbehandelten Ker-K^b Gruppe. Diese Diskrepanz ist umso bemerkenswerter, da Ker-K^b nach dem Transfer aktivierter Des⁺ T-Zellen und CpG-ODN-Behandlung keinen Leberschaden aufweisen. Der Unterschied scheint somit nicht in den Des⁺ T-Zellen selbst zu liegen. Eine mögliche Antwort auf diese Frage beruht auf der Tatsache, daß die Integration der Transgene für α - und β -Kette des Des-TZR endogene Gene zerstören oder beeinträchtigen könnten (Constantini *et al.*, 1989), und dieser Defekt nur in bestimmten Situationen zum Vorschein kommt. So gibt es Hinweise aus Experimenten, wo verschiedene transgene Linien des Des⁺ TZR (10402, 10395) sehr unterschiedlich auf Infektionen mit *Listeria monocytogenes* reagierten (Andreas Limmer, persönliche Kommunikation). Um diesen Sachverhalt zu klären, sollen CRP-K^b und Ker-K^b

Tiere mit einer anderen DesTZR-positiven Linie verpaart werden, und die Versuche wiederholt werden. Dies würde auch den Anteil des autoimmunen Leberschadens in CRP-K^b x DesTZR Tieren genauer charakterisieren. Eine zweite Kontrolle ist die Applikation von CpG-ODN in einzeltransgene DesTZR-Tiere, die nur in einer der beiden transgenen Linien zu Leberschaden führen sollte.

Im Zusammenhang mit der Abhängigkeit vom transgenen TZR-Repertoire fällt auf, daß CRP-K^b- und Ker-K^b-Tiere, die über 8 Tage CpG-ODN erhalten haben, keinen signifikanten Leberschaden aufweisen. CpG-ODN ist weder in der Lage eine Immunreaktion gegen ein transgenes (K^b) noch gegen ein nicht-transgenes Antigen in der Leber zu induzieren, wenn das behandelte Tier ein normales TZR-Repertoire besitzt. Es bedarf somit besonderer Bedingungen auf Seiten des TZR-Repertoires als auch auf Seiten des Antigens, um eine Autoaggression gegen Lebergewebe zu induzieren. Dies reflektiert möglicherweise das relativ seltene Auftreten von autoimmuner Hepatitis, denn nur 5 bis 8 von 100.000 Europäern erkranken an AH. Die Abhängigkeit von einem bestimmten MHC-Allel (H-2K^b in unserem Mausmodell) spiegelt möglicherweise die Assoziation von autoimmuner Hepatitis mit bestimmten HLA-Allelen (A1, B8, DR3) wieder.

6. Die induzierte Autoimmunität ist transient.

Die Autoimmunreaktion gegen Lebergewebe hatte sowohl im adoptiven Transfer als auch im doppeltransgenen System nur einen transienten Charakter (Abb. 8, 9 und 14). Dieses Ergebnis entspricht den Resultaten, die mit einer Listerieninfektion erhalten wurden (Limmer *et al.*, 1998). Der Leberschaden konnte zwar durch erneute Injektionen von CpG-ODN reinduziert und verlängert werden, nahm aber bei fortschreitender Applikation keinen chronischen Verlauf an.

Ebenfalls nur transients Leberschaden war auch in Alb-LCMV-GP-Tieren nach Aktivierung transferierter GP-spezifischer T-Zellen mittels LCMV-Infektion nachweisbar (Voehringer *et al.*, 2000). Der Schaden erreichte sein Maximum an Tag 8 und nahm mit der Eliminierung der Infektion ab. Auch der autoimmune Angriff auf HBsAg-exprimierende Hepatozyten durch transferierte spezifische CD8⁺ T-Zellen war nur transient (Ando *et al.*, 1993).

Die Situation in diesen Tiermodellen reflektiert die klinische Situation verschiedener Autoimmunerkrankungen des Menschen nicht vollständig. Eine autoimmune Hepatitis wird erst diagnostiziert, wenn die Leberschädigung mindestens über einen Zeitraum von 3 Monaten anhält. Nur eine chronisch verlaufende Hepatitis resultiert letztendlich in Zirrhose

und den Tod des Patienten. Autoimmune Hepatitis, MS und Arthritis zeigen keinen monophasischen Verlauf, sondern ein Abwechseln zwischen Phasen der Gewebeschädigung und der Erholung. In der Maus kann eine wiederkehrende autoimmune Lebererkrankung in immundefizienten SCID-Mäusen, die das gesamte HBV-Genom als Transgen tragen, induziert werden. Sie weisen replizierende Viren in ihrer Leber auf und entwickeln nach Transfer naiver T-Zellen chronische Hepatitis, die ebenfalls in Wellen verläuft (Larkin *et al.*, 1999).

Eine Ursache für den wellenförmigen Verlauf von Autoimmunerkrankungen kann die sequentielle Aktivierung von T-Zellen gegen verschiedene Selbstepitope sein, die erst im Laufe der Immunantwort freigesetzt werden. Dieser Vorgang wird als Epitop-Wandern bezeichnet (Vanderlugt und Miller, 1996). Wiederkehrende EAE in Mäusen ist ein Beispiel dafür. Nach Induktion von EAE mit dem immundominantem PLP-Epitop, wandert die T-Zell-Antwort erst zu einem Epitop im gleichen Molekül (intramolekular) und geht dann auf ein Epitop eines anderen nervenzellspezifischen Antigens (MBP) über (intermolekular) (Yu *et al.*, 1996). Für die Leber ist ein solches Epitop-Wandern nicht beschrieben.

Für die Leber sind Mechanismen beschrieben, die Immunreaktionen aktiv zum Erliegen bringen. Die Gruppe um Crispe beschreibt ein System, bei dem aktivierte CD8⁺ T-Zellen in die Leber wandern, um dort zu sterben. Die Leber wurde daraufhin als Elefantengrab bezeichnet. Um dieses Phänomen zu erzeugen, wurde eine große Menge hochaffinen Peptids in TZR transgene Tiere systemisch appliziert werden (Russel *et al.*, 1998). Aktivierte und nicht naive oder apoptotische T-Zellen werden über ICAM auf SEC und KC selektiv in der Leber zurückgehalten (Mehal *et al.*, 1999), regulieren anschließend CD8 und TZR herunter und B220 herauf (Huang *et al.*, 1994a), um dann nach Induktion eines transienten Leberschadens durch Apoptose zu sterben (Huang *et al.*, 1994b; Mehal *et al.*, 1998). Je nach der Art der Stimulation sterben T-Zellen allerdings auch in der Lunge oder Niere (Wack *et al.*, 1997). Diese Ergebnisse dürfen jedoch nicht ohne weiteres auf eine normale Immunantwort übertragen werden, da in diesen Systemen ein tolerogenes Protokoll verwendet wird, daß heißt es wird ein CD8-Zell-Peptid systemisch in Abwesenheit eines Adjuvanz appliziert. Der Mangel an Kostimulation und an CD4-Zell-Hilfe programmiert die CD8 Zellen vermutlich schon bei der Stimulierung zum Zelltod.

In unserem Modell scheint Deletion wenigstens nach dem ersten Abklingen des Leberschadens in Alb-K^b-Tieren, die mit aktivierten Des⁺ T-Zellen transferiert worden sind, zumindest nicht signifikant zu sein, da durch erneute Gabe von CpG-ODN der Schaden reinduziert werden kann (Abb. 9). Da der Leberschaden trotz kontinuierlicher Applikation

von CpG-ODN jedoch erneut abfällt könnte Deletion eine Rolle spielen. Ähnlich stellt sich die Situation in CRP-K^b x DesTZR dar. Auch hier fällt der anfängliche Leberschaden trotz anhaltender Injektion von CpG-ODN auf normale Werte ab (Abb. 14). Diese Abnahme des Leberschadens korreliert mit der Reduktion von CD8-T-Zellen selektiv in der Leber (Abb. 15). Die Ursache für das "Verschwinden" der Zellen könnte auf Deletion beruhen. Eine andere Erklärung wäre, daß die aktivierten T-Zellen die Leber wieder verlassen, und reaktiv bleiben. Diese Frage soll in kommenden Experimenten durch die nachfolgende Applikation eines K^b-positiven Tumors getestet werden, der von anwesenden aktivierten oder Gedächtnis-Des⁺ T-Zellen abgestoßen werden müßte.

Die Leber kann nicht nur durch Deletion schädigende T-Zell-Antworten abwehren, sondern auch durch Immunsuppression bzw. Immundeviation von Th1 zu Th2. Ursache ist die schnelle und potente Produktion von immunsuppressiven Zytokinen, vor allem TGF- β und IL-10 (Knolle *et al.*, 1995a), als auch Prostaglandinen wie PGE₂ durch Kupffer Zellen (Knolle *et al.*, 1995b), LSEC und Hepatozyten (Alfrey *et al.*, 1995). LSEC und Kupffer Zellen produzieren unter physiologischen Bedingungen TGF- β (Bissell *et al.*, 1995) und PGE₂ (Rieder *et al.*, 1990). IL-10 Sekretion folgt auf leberschädigende Behandlungen wie *Corynebacterium parvum* + LPS (Arai *et al.*, 1995), Galaktosamin + LPS (Santucci *et al.*, 1996), *Toxoplasma gondii* Infektion (Gazzinelli *et al.*, 1996) oder ConcanavalinA-Applikation (Louis *et al.*, 1997) und verringert die Konzentrationen von IFN- γ , TNF- α und IL-12 und damit den Leberschaden. Besonders die Reduktion von IL-12 und die Sekretion von IL-10, IL-4 und TGF- β ermöglichen die Unterdrückung einer Th1-Antwort und die Entstehung einer Th2-Antwort, die charakteristisch ist für Immunreaktion in der Leber. So sind die Antikörper, die mit autoimmunen Lebererkrankungen wie Primäre Biliäre Cirrhose (PBC) und chronisch aktive Hepatitis (CAH) assoziiert sind vorwiegend Antikörpern des IgG1-Subtyps, der eine Th2-Antwort widerspiegelt. Immunsuppressive Zytokine können auch in anderen Organen Th1-vermittelte Autoimmunerkrankungen inhibieren. IL-4 (Mueller *et al.*, 1996) und TGF- β (King *et al.*, 1998) verhindern bei transgener Expression in den β -Inseln des Pankreas die Entwicklung von Diabetes in NOD-Weibchen. Transgenes ZNS-spezifisches IL-4 unterdrückt auch EAE-Induktion in SJL/J-Mäusen (Furlan *et al.*, 1998). IL-4 und TGF- β haben auch bei autoimmuner Thyreoditis eine suppressive Funktion (Seddon und Mason, 1999).

Neben immunsuppressiven Zytokinen können auch proinflammatorische Zytokine bei chronischer Applikation bzw. bei der Anwesenheit während der Effektorphase suppressiv wirken (Falcone und Sarvetnick, 1999b). Das gilt auch für die durch CpG-ODN induzierten

Zytokine IL-12, TNF- α und IFN- γ . Das Ausschalten des TNF- α -Gens macht 129-Mäuse empfindlich gegenüber MOG-induzierte EAE. Umgekehrt führt die systemische TNF- α -Applikation zu einer Verringerung der autoimmunen Demyelinisierung nach Induktion (Liu *et al.*, 1998). Auch die transgene Expression von TNF- α in den β -Inseln von NOD-Weibchen spät in der Entwicklung verhindert die Entstehung von IDDM (Grewal *et al.*, 1996). Als Mechanismen werden Herunterregulierung der Th1-Antwort (McSorley *et al.*, 1997), Apoptose-Induktion in autoreaktiven T-Zellen (Liu *et al.*, 1990; Zheng *et al.*, 1995; Sytwu *et al.*, 1996) und beeinträchtigte TZR-Signaltransduktion (Cope *et al.*, 1997) diskutiert. IFN- γ kann ebenfalls in der Suppression von IDDM (Krakowski *et al.*, 1996; Willenborg *et al.*, 1996) und EAE (Kumar *et al.*, 1998; Falcone *et al.*, 1999a) entscheidend sein. IFN- γ wirkt in bestimmten Situation direkt inhibitorisch auf T-Zellen (Holda *et al.*, 1986 und 1988; Huchet *et al.*, 1993; Meyers *et al.*, 1999) oder verursacht Bcl2-regulierte Apoptose in autoreaktiven T-Zellen (Tarrant *et al.*, 1999). Die Injektion von IL-12 für 15 Wochen einmal wöchentlich vermeidet die Entwicklung von IDDM in NOD-Weibchen (O'Hara *et al.*, 1996). IL-12 supprimiert, vermutlich über die Hyperinduktion von IFN- γ , Experimentelle Autoimmune Uveitis (Tarrant *et al.*, 1998).

7. Vergleich zu Molekularer Mimikry und „Bystander“ Aktivierung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Induktion einer Entzündungsreaktion in der Leber sowohl T-Zellen antigenspezifisch aktivieren als auch das Zielorgan für einen autoimmunen Angriff konditionieren kann. Es bedarf in diesem System keiner T-Zell-Epitope eines Pathogens um den Prozess in Gang zu setzen.

Damit wird molekulare Mimikry als Mechanismus ausgeschlossen. Unter molekularer Mimikry versteht man die Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen durch strukturelle Ähnlichkeit von körpereigenen und mikrobiellen Epitopen. So führt eine LCMV-Infektion von Mäusen, die das Glykoprotein (GP) von LCMV in den β -Zellen des Pankreas exprimieren, zu einer Aktivierung der transgenen GP-spezifischen CD8⁺ T-Zellen und zu autoimmunem Diabetes (Ohashi *et al.*, 1991). Es gibt jedoch auch in diesen Modellen Hinweise, daß die Aktivierung der autoreaktiven T-Zellen nicht ausreicht, um IDDM zu verursachen. Werden aktivierte T-Zellen aus einer infizierten LCMV-GP x TCR-Maus in einen nicht infizierten LCMV-Rezipienten transferiert ist keine Diabetes-Induktion zu beobachten (von Herrath *et al.*, 1995). Es konnte in der gleichen Veröffentlichung gezeigt werden, daß LCMV auch die Langerhansschen Inseln des Pankreas infiziert und damit eine Infiltration zuerst von Makrophagen und anschließend von T-Zellen ermöglicht. Infiziert man

RIP-GP-Tiere mit einem GP-kodierenden Vaccinia-Vektor kommt es nicht zu Diabetes, obwohl aktivierte GP-spezifische Zellen vorhanden sind. Vaccinia-GP-Infektion führt erst dann zu Diabetes, wenn neben GP auch TNF- α auf den β -Zellen transgen exprimiert ist, was den aktivierten T-Zellen den Zugang ins Gewebe ermöglicht (Ohashi *et al.*, 1993).

Auch in Modellen für Molekulare Mimikry ist sowohl Aktivierung als auch Konditionierung des Zielgewebes notwendig, um eine Autoimmunreaktion zu induzieren.

Unsere Ergebnisse schließen außerdem einen zweiten Mechanismus aus, der für die infektionsbedingte Induktion von Autoimmunität beschrieben wurde. Bei der sogenannten „Bystander“-Aktivierung werden autoreaktive T-Zellen, deren TZR nicht mit mikrobiellen Epitopen kreuzreagieren, im Zuge einer Immunreaktion gegen das Pathogen aktiviert (Whitton und Fujinami, 1999). Interessanterweise liefert erneut ein Mausmodell für Diabetes Hinweise auf „Bystander“-Aktivierung. Infektionen mit Coxsackie-Virus Typ B (CVB) ist beim Menschen mit der Entwicklung von Diabetes assoziiert und führt in Mäusen zu einer starken Zerstörung des exokrinen Pankreas. Die CVB-Infektion von Mäusen führt zur Aktivierung von T-Zellen, deren transgener TZR kein Virus-Epitop erkennt, so daß Kreuzreaktivität ausgeschlossen werden kann (Horwitz *et al.*, 1998). Es wurde vermutet, daß das Zytokinmilieu und die Freisetzung großer Mengen Autoantigene aufgrund der zytolytischen Aktivität des Virus die „Bystander“-Stimulation ermöglichte. Da CVB auch den endokrinen Pankreas infiziert besteht ebenfalls die Möglichkeit, daß die transgenen T-Zellen direkt auf β -Zellen aktiviert werden.

Da CpG-ODN keine T-Zell-Epitope liefern kann, zeigt unser System, daß Autoimmunität völlig unabhängig von Fremdepitopen induziert werden kann. Eine Entzündungsreaktion ist ausreichend, um in Abwesenheit jeglicher pathogen-spezifischer T-Zell-Aktivierung Leberschaden zu induzieren. Möglicherweise ist aber auch dieser Punkt für die mangelnde Chronizität in unserem System entscheidend.

B. Teil II : Etablierung eines induzierbaren autochthonen

Lebertumormodells

Im ersten Teil der Diskussion wurde ein Maussystem beschrieben, in dem neben der Aktivierung der T-Zellen auch eine Konditionierung des Zielorgans (der Leber) in Form einer Entzündung notwendig war, um eine Immunreaktion gegen *gesundes* Gewebe zu induzieren. Der zweite Teil der Arbeit soll die Grundlage schaffen, die Relevanz einer Entzündungsreaktion bei der T-Zell-Antwort gegen *malignes* Lebergewebe zu untersuchen.

Diese Fragestellung beruht auf der Tatsache, daß eine bloße Anwesenheit aktivierter tumorreaktiver T-Zellen nicht ausreicht um eine vollständige Tumorabstoßung zu ermöglichen. Im Patienten liegt die Abstoßungsrate nach Behandlung selten höher als 30% (Rosenberg *et al.*, 1996). Die Gründe hierfür können unterschiedlicher Natur sein und beinhalten neben dem Verlust des Antigens (Jager *et al.*, 1996) oder der Antigenpräsentation (Rivoltini *et al.*, 1995; Garrido *et al.*, 1997) auch die Toleranzinduktion (Strand *et al.*, 1996; Hahne *et al.*, 1996) oder Suppression (Torre-Amione *et al.*, 1990) tumorspezifischer T-Zellen. Darüberhinaus gibt es ebenfalls Daten, daß die Unzugänglichkeit des Tumorgewebes den Kontakt der tumorreaktiven T-Zellen mit den Tumorzellen verhindert. So führt der adoptive Transfer von aktivierten SV40Tag-spezifischen CD4⁺ T-Zellen in Tiere, die aufgrund der Expression von Tag in den β -Zellen des Pankreas Insulinome tragen nicht zu Infiltration (Ganß *et al.*, 1998 und 1999). Erst wenn der tumortragende Rezipient vor Transfer radioaktiv bestrahlt wird, was unter anderem zu einer entzündlichen Veränderung von Endothelien führt (Hallahan und Virudachalam, 1997), kann Infiltration nachgewiesen werden. Dies ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung, daß Lymphozyten eine verringerte Interaktion mit Tumorendothel *in vitro* und *in vivo* aufweisen (Wu *et al.*, 1992; Onrust *et al.*, 1996). Auch in anderen Systemen konnte in den letzten Jahren das Ausbleiben einer Tumorabstoßung trotz Anwesenheit sowohl des Antigens auf Tumorzellen als auch tumorantigenspezifischer T-Zellen gezeigt werden (Speiser *et al.*, 1997; Wick *et al.*, 1997; Hermans *et al.*, 1998; Prévost-Blondel *et al.*, 1998) obwohl diese T-Zellen nichtmalignes Gewebe angreifen können (Perdrizet *et al.*, 1990). Neben immunspezifischen Ausweichstrategien von Tumoren könnten ebenfalls aberrante physiologische Eigenschaften, wie hoher Tumorbinnendruck und geringer Sauerstoffgehalt (Jain *et al.*, 1988) für eine uneffiziente Immunreaktion verantwortlich sein.

Es stellt sich somit die gleiche Frage wie bei der Induktion von Autoimmunität. Welche Rolle kommt der Konditionierung des Tumors in der Tumorimmuntherapie zu ?

Um die Rolle der Entzündungsreaktion bei der T-Zell-abhängigen Immunantwort gegen Lebertumor untersuchen zu können, sollte ein Lebertumorsystem in der Maus etabliert werden. Die Entscheidung, ein Lebertumormodel aufzubauen beruhte einerseits auf den Erfahrungen von Autoimmunreaktionen gegen gesundes Lebergewebe und andererseits auf der Relevanz von Lebertumoren in der Klinik. So sterben pro Jahr 250.000 Menschen an Tumoren der Leber, die damit zu den häufigsten Neoplasien weltweit gehören (Kew *et al.*, 1986).

Transplantationstumoren stellen kein geeignetes System dar, da sie nicht primäre (autochthone) Tumoren des Menschen repräsentieren. Die unterschiedliche Effektivität von Immuntherapien gegen transplantierte und autochthone Tumoren konnte erst kürzlich wieder bestätigt werden (Willimsky und Blankenstein, 2000). So führte die Applikation eines adenoviralen Vektors, der IL-7 und B7.1 kodiert, zwar zur Abstoßung eines etablierten transplantierten aber nicht eines autochthonen Tumors, der durch die Applikation von Methylcholanthren auf die Haut erzeugt wurde. Der transplantierte Tumor entstammte ebenfalls einem Methylcholanthren-induzierten autochthonen Tumor.

Ein häufig verwendeter Mechanismus in Versuchstieren experimentelle autochthone Tumoren zu induzieren, beruht auf der transgenen gewebespezifischen Expression eines Onkogens. Sehr potente Onkogene, wie z.B. das große T(umor)-Antigen von SV40, ermöglicht auf diese Weise eine schnelle und gewebespezifische Entstehung von autochthonen Tumoren. Ein entscheidender Nachteil der herkömmlichen Onkogen-transgenen Tiere liegt darin, daß alle Zellen, in denen der verwendete organspezifische Promotor aktiv ist, das Onkogen exprimieren und somit potentiell transformieren können. So ist es bis jetzt in keinem Onkogen-transgenen System gelungen, das Tumorstadium vollständig zu unterbinden. Der Gruppe um Knowles gelang es zwar das Wachstum von Insulinomen in Tieren, die Tag unter dem Ratten-Insulin-Promotor herstellen, um maximal ein Jahr hinauszuzögern (Ye *et al.*, 1994). Die Tiere entwickelten letztendlich doch wieder Insulinome. Da dies eine, selbst im Vergleich zur Situation eines Tumorpatienten ungünstige Ausgangsposition für eine Tumormodell ist, haben wir uns entschieden ein über cre/loxP-induzierbares SV40T-Antigen-(Tag)-transgenes System zu etablieren, das Onkogen-Expression nur in einem Teil der Leberzellen ermöglichen soll. Dazu wird cre-Rekombinase nur in einem begrenzten Teil der Hepatozyten exprimiert oder aktiviert. Ein weiterer Vorteil des induzierbaren Ansatzes liegt in der Möglichkeit die Tumorentstehung erst im adulten Tier induzieren zu können. Die späte Expression des Onkogens vermeidet auch Toleranzinduktion gegen Tag während der neonatalen Phase, da Gewebe in diesem Zeitraum für naive T-Zellen

zugänglich sind (Alferink *et al.*, 1997). Tag schien als Onkogen geeignet, da es verlässlich und schnell Zellen nahezu aller Organe transformieren kann. Außerdem besitzt unser Labor sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺-abhängige TZR-transgene Mauslinien, die für Tag-Epitope spezifisch sind. Dies ermöglicht Studien über die Interaktionen von tumorspezifischen CD4 (Förster *et al.*, 1995) und CD8 T-Zellen (Geiger *et al.*, 1992) in der Tumorummunologie, was bis jetzt noch nicht möglich war.

Dieser Ansatz weist jedoch auch Nachteile auf. Tumorentstehung in onkogen-transgenen Mäusen bedarf Monate und ist somit deutlich zeitaufwendiger als Experimente mit Transplantationstumoren. Außerdem streben wir an, das Onkogen nur in einem Teil der Hepatozyten zu exprimieren, was die Onkogenese weiter verlängern könnte. Die Abhängigkeit von zufälligen Folgemutationen für die vollständige Transformation kann außerdem eine größere Varianz in der Kinetik der Tumorentstehung zur Folge haben. Die Beobachtung in anderen Tag-transgenen Modellen, daß die späte Expression des Onkogens zu einer Immunreaktion gegen das Neoantigen führt (Adams *et al.*, 1987; Faas *et al.*, 1987; Geiger *et al.*, 1993) muß kein Nachteil sein, da auch im Tumorpatienten häufig tumorspezifische T-Zellen aktiviert werden.

1. Bewertung der geflochten Mäuse ATI und AST

Wir haben zwei verschiedene Ansätze zur cre-vermittelten Induktion der T-Antigene gewählt (Abb. 17). Bei dem AST-(Albumin-floxstop-Tag)-Konstrukt ist der Albumin-Promotor von der Tag-kodierenden Sequenz durch eine Kasseette getrennt, die eine Polyadenylierungssequenz und ein Translationsstop enthält. Vergleichbare Ansätze wurden schon für die Tag-Expression in der Linse des Auges (Lakso *et al.*, 1992; Pichel *et al.*, 1993), in Nervenzellen (Isaka *et al.*, 1999) und bei der Induktion von Reportergenen (Akagi *et al.*, 1997; Soriano *et al.*; Lobe *et al.*; Mao *et al.*; Michael *et al.*, alle 1999) erfolgreich eingesetzt. In unserem System läuft die Cre-vermittelte Rekombination auf genomischer Ebene nach Verpaarung der geflochten Tiere mit cre-deleter-Tieren (Schwenk *et al.*, 1995) zuverlässig bei allen 5 getesteten Linien ab (Abb. 24). Da die unterschiedlichen Linien, die deutlich unterschiedliche Transgenkopien enthalten, nach Rekombination ähnlich schwache Banden im Southern Blot aufwiesen, war die Rekombination vermutlich vollständig und hinterließ nur eine Transgenkopie am Locus, was auch in anderen Systemen beschrieben wurde (Lakso *et al.*, 1996; de Wit *et al.*, 1998). Allerdings war nur bei 2 Linien Expression von Tag wie auch die darauffolgende Tumorentwicklung in der Leber zu erkennen (Abb. 24 und 27). Ursache hierfür ist vermutlich der Integrationsort der Transgenkopien, der zwar cre-vermittelte

Rekombination aber nicht Expression erlaubt. Die beiden AST-Linien ergaben leider nur in einem kleinen Teil der doppeltransgenen Tiere Tumorentwicklung.

Der zweite Ansatz war erfolgreicher. Hier sollte Tag-Expression durch die Inversion der Tag-Sequenz, die in inverser Orientierung hinter dem Albumin Promotor positioniert und von 2 gegensinnig angeordneten loxP-Stellen flankiert ist, induziert werden (Alb-Taginvers; kurz ATI). Die Strategie durch Inversion ein Transgen zu aktivieren wurde auch von der Gruppe um Rajewsky in B-Lymphozyten im Mausmodell eingesetzt (Gu *et al.*, 1993; Lam *et al.*, 1998). ATIXcre-deleter-Tiere waren im Unterschied zu AST zuverlässig in der Kinetik und Penetranz der Tumorentwicklung (Abb. 24). In den ersten 1,5 bis 5 Monaten konnten alle Zwischenstadien der Tumorbildung in transgenen Mäusen histologisch identifiziert werden (Dysplasie, Hyperplasie, prämaligne Foci, Adenome) (Abb. 26). Im Alter von 6 Monaten trugen alle untersuchten ATIXcre-deleter Tiere multifokale Karzinome im fortgeschrittenen Stadium und die Lebermasse wuchs von normalen 1 bis 1,5g auf 10 bis 16g an. Wann Tumorstadium in unseren Tieren zum Tod führt wurde nicht ermittelt, da sie spätestens nach 9 Monaten analysiert wurden. Überraschend war, daß Weibchen im Alter von 9 Monaten mit über 50% Tumormasse im Vergleich zum Restkörpergewicht noch Würfe zur Welt brachten und rein äußerlich gesund aussahen.

Hier zeigt sich jedoch schon die verzögerte Kinetik der Tumorentwicklung im Vergleich zu Mäusen, die mehrere Kopien des Tag-Transgens ebenfalls unter der Kontrolle des Albumin-Promotors in Hepatozyten exprimieren (Hino *et al.*, 1989; Sandgren *et al.*, 1989). Diese entwickelten schon einen Monat nach Geburt eine Vergrößerung der Leber um ein Vielfaches, nach 2 Monaten die Entstehung von Foci atypischer Leberzellen und nach 3 bis 7 Monaten multifokale Karzinome und Adenome, die eine Größe erreichten, die zur Ausdehnung des Abdomens führte. Die Tiere verstarben nach 6 bis 8 Monaten. Unsere rekombinierten transgenen ATI-Tiere zeigten somit ein um ca. 1-2 Monate langsames Tumorstadium, was sicherlich darauf zurückzuführen ist, daß ATI-Tiere nach Rekombination nur noch eine Transgenkopie tragen und deswegen vermutlich auch weniger Tag exprimieren. Allerdings führt in einem anderen System eine Reduktion der Kopienzahl zu einer verstärkten Expression des Transgens in Mäusen (Garrick *et al.*, 1998). Diese Unterschiede beruhen vermutlich auf den unterschiedlichen regulatorischen Elementen, die zum Einsatz gekommen sind.

Das Ergebnis, daß ATIXcre-deleter eine verlässlichere Tumorentwicklung aufweisen würden als ASTXcre-deleter war unerwartet, da aufgrund der Reversibilität der Inversion nur 50% der Leberzellen in ATI-Tieren Tag exprimieren sollten, während in AST theoretisch alle

Hepatozyten in der Lage sein müßten Tag herzustellen. Dieser Punkt ist noch nicht geklärt. Die Tatsache, daß nach Rekombination nur eine Transgen-Kopie am Locus zurückbleibt, sollte kein Grund für ausbleibende Tumorentwicklung sein, denn ATIxcre-deleter-Tiere weisen ein ähnlich schwaches Signal im Southern Blot auf wie ASTxcre-deleter-Tiere. Dieses Problem könnte sich auch bei dem zweiten Konstrukt mit einer floxstop-Kassette ergeben, bei dem Tag nach Rekombination unter die Kontrolle des β -Aktin-Promotors gelangt. Da wir diese Tiere erst vor kurzem erhalten haben, bedarf es noch etwas Geduld, um diesen Punkt zu klären.

In histologischen Analysen verschiedener Organe (Abb.31) gab es trotz fortgeschrittenen Hepatozellulären Karzinomen keinen Hinweis auf ektopische Transformation in anderen Zellen der Leber oder in anderen Geweben oder Organen von ATIxcre-deleter Tieren. Für Metastasierung, vor allem in Lungengewebe, wie sie bei einzelnen Linien anderer Alb-Tag-Systeme beschrieben wurden (Hino *et al.*, 1989), gab es ebenfalls keine Anhaltspunkte.

Die Verwendung des gewebespezifischen Albumin-Promotors in den geflochten Konstrukten hat Vor- und Nachteile. Ein Vorteil dieses Ansatzes ist die Möglichkeit, *konstitutiv* exprimierende Alb-Tag-Tiere generieren zu können. Dies erreicht man durch die Verpaarung der geflochten gewebespezifischen Tiere mit Mäusen, die Cre-Rekombinase in der Keimbahn exprimieren (z.B. cre-deleter-Tiere), so daß alle Nachkommen ein rekombiniertes gewebespezifisch exprimiertes Transgen tragen. Mit einer Maus, deren gefloxtes Konstrukt einen *ubiquitären* Promotor enthält, und deren gewebespezifische Expression auf der gewebespezifischen Applikation von Cre beruht (z.B. durch gewebespezifische cre-transgene Mäuse oder retrovirale Vektoren u.a.), besteht diese Möglichkeit nicht. Gewebespezifische geflochte Linien weisen nach Rekombination in der Keimbahn 2 Unterschiede zu normalen transgenen Tieren auf. Erstens haben sie nur eine Transgenkopie im Locus. Zweitens bleibt eine loxP-Stelle (bei gleichsinniger Orientierung von loxP, z.B. AST) oder 2 loxP-Stellen (bei gegensinniger Orientierung von loxP, z.B. ATI) zurück. Bei ATI-Tieren ist eine Verpaarung mit cre-deleter Tieren, die Cre-Rekombinase in der Keimbahn exprimieren (cre-deleter) somit noch nicht ausreichend, um konstitutiv exprimierende Tiere zu generieren. Da immer mindestens zwei loxP-Stellen in gleichsinniger Orientierung im Genom zurückbleiben und Inversion ständig stattfinden kann, muß Cre durch eine weitere Verpaarung entfernt werden. Auf diesem Wege konnten wir zwei rekombinierte ATI-Linien etablieren, die entweder konstitutive („sense“-Orientierung von Tag) oder induzierbare („antisense“-Orientierung von Tag) Tag-Expression möglich machen und beide nur eine Transgenkopie tragen (Abb. 30).

Diese Linien generieren zu können hat sich als wichtig herausgestellt, da ATI-Tiere ohne Rekombination schon geringe Tag-Expression aufweisen, die jedoch histologisch nicht für Transformation ausreichend war (Abb. 28). Ursache für die Undichtigkeit ist vermutlich die inverse Orientierung des Albumin-Promotors vor der Tag-Sequenz, die durch die Anwesenheit multipler Kopien des Transgens zustande kommt. Die gleiche Situation führte bei der Verwendung des Ratten-Insulin-Promotors vor der Tag-Sequenz zu Expression in den β -Zellen des Pankreas (Hanahan, 1995) (Abb. 29). Wir konnten somit durch die Verwendung des Albumin-Promotors drei verschiedene Linien etablieren (Abb. 30), die für unterschiedliche Fragestellungen eingesetzt werden können. ATI-Tiere, die eine schwache Expression ohne Transformation aufweisen, könnten gegenüber der Applikation karzinogener Substanzen susceptibler sein und schneller Tumoren entwickeln. Rekombinierte ATI-Tiere, die Tag konstitutiv exprimieren, könnten bei Expression von Geburt an immunologische Toleranz gegen Tag induzieren und damit einen Vergleich möglich machen zu rekombinierten ATI-Tieren, die Tag erst nach Rekombination exprimieren. Diese letzte Linie soll dazu dienen die angestrebte Fragestellung zu untersuchen, welche Rolle Entzündungsreaktionen bei der T-Zell-Antwort gegen induzierte autochthone Tumoren spielen.

Die Verwendung eines gewebespezifischen Promotors vor dem geflochten Gen hat auch einen Nachteil. Ein wesentlicher Vorteil des cre/loxP-Systems ist nämlich sein modularer Aufbau der durch die Verpaarung von gewebespezifischen cre-exprimierenden Mäusen mit Tieren, die das geflochte Transgen unter der Kontrolle eines *ubiquitären* Promotors tragen. Da die Zahl der gewebespezifischen cre-Tiere immer weiter ansteigt, kann durch die Generierung einer einzigen geflochten Maus das Transgen in nahezu jedem Gewebe angeschaltet werden. Die vorhandenen gewebsspezifischen cre-Mäuse erlauben mittlerweile spezifische Rekombination in T-Lymphozyten (Gu *et al.*, 1994), B-Lymphozyten (Rickert *et al.*, 1997) und Makrophagen (Takeda *et al.*, 1999), im Nervensystem (Tsien *et al.*, 1996), in β -Zellen des Pankreas (Postic *et al.*, 1999), in der Leber (Postic *et al.*, 1999), in Keratinozyten (Tarutani *et al.*, 1997), im Muskel (Wang *et al.*, 1999; Miniou *et al.*, 1999) und anderen Zelltypen. Um diese Möglichkeit auch in unserem System nutzen zu können, haben wir in einem weiteren Konstrukt statt dem Albumin-Promotor den ubiquitären β -Aktin-Promotor vor die geflochte Stop-Kassette und die Tag-Sequenz gesetzt. Wie schon oben erwähnt führte die Mikroinjektion dieses Konstrukts bisher erst zu einer Linie. Weitere Linien sollen mittels Mikroinjektion generiert und anschließend analysiert werden.

2. Zwei Alternativen cre in das System einzubringen.

Nach der Etablierung von zwei ATI-Linien, die zuverlässig Lebertumoren nach Rekombination bilden, bedurfte es noch einer Methode, mit der Tag in adulten Tieren induziert werden kann. Wir haben uns für zwei Alternativen entschieden (Abb. 18).

Erstens die intravenöse Applikation von Liposomen, die cre-kodierende Plasmide tragen (Ledley, 1995). Diese Methode hat sich beim Gentransfer in zahlreiche Gewebe (Zhu *et al.*, 1993) aber auch speziell Hepatozyten in verschiedenen Systemen bewährt (Alino, 1997). Die geringe Gentransferrate, die mittels Liposomen erreicht wird stellt meist einen Nachteil dar. In unserem Falle möchten wir dies als Vorteil nutzen, da nur ein kleiner Teil der Hepatozyten die Möglichkeit haben soll, transformieren zu können. Die Gentransferrate in Leberzellen liegt bei ca. 1-5% und kann durch die Verwendung von Proteinen, wie z.B. Liganden leberspezifischer Rezeptoren (Asialoglykoprotein-Rezeptor; Wu *et al.*, 1989; Ferkol *et al.*, 1993), partielle Hepatektomie (Crespo *et al.*, 1996) oder durch die Applikation über die Leberpfortader (Kaneda *et al.*, 1989) erhöht werden. Alle drei Methoden sind vergleichsweise aufwendig und erhöhen im Fall der Rezeptorliganden und Hepatektomie gleichzeitig die Immunogenität. Das Risiko einer Immunreaktion und der damit verbundenen Entzündung soll jedoch im Hinblick auf die Fragestellung vermieden werden. Aus diesem Grunde fällt auch adenoviraler Gentransfer für die Applikation von cre-Rekombinase aus (Akagi *et al.*, 1997; Kafri *et al.*, 1998). Weitere Vorteile von Liposomen als Genfähren sind minimale Toxizität, leichte Abbaubarkeit und einfache Herstellung sowie Anwendung (Li *et al.*, 1997)

In ersten Experimenten konnte gezeigt werden, daß der Transfer von cre-kodierenden Plasmiden über Liposomen in unserem System zu partieller Rekombination des AST-Konstrukts in Leberzellen führt (Abb. 36). Die Verwendung des Albumin-Promotors bei der Regulierung der cre-Expression soll sicherstellen, daß Rekombination nur in Hepatozyten und nicht in anderen Zellen des Körpers möglich ist, wie z.B. in der Lunge, die einen großen Teil der Liposomen aus dem Blutstrom abfängt (Li *et al.*, 1997). Ob die geringe Zahl an transfizierten Hepatozyten ausreicht, um ausreichend schnell Tag-Expression und Tumorentwicklung zu induzieren muß abgewartet werden.

Unser zweiter Ansatz zur zeitlich definierten Einbringung von Cre in das System besteht in der Generierung von transgenen Mäusen, die Cre zusammen mit einer Ligandbindedomäne (LBD) eines Steroidrezeptors als Fusionsprotein konstitutiv exprimieren. Erst nach Zugabe eines Steroids löst sich das Fusionsprotein vom Hitzeschockprotein90-Komplex und wandert in den Kern, um dort loxP-Stellen zu rekombinieren. Von den drei bisher beschriebenen LBD, die des Östrogenrezeptors (ER), Progesteronrezeptors (PR;

Kellendonk *et al.*, 1999) und Glukokortikoidrezeptors (GR; Brocard *et al.*, 1998), haben wir uns für die LBD des Östrogenrezeptors entschieden, da diese LBD durch gezielte Mutationen weniger auf endogene und stärker auf synthetische exogene Steroide anspricht und *in vitro* (Metzger *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1996) als auch *in vivo* erfolgreich eingesetzt wurde (Feil *et al.*, 1996). Die Zahl creER-transgener Mäuse hat seit Beginn der Arbeit deutlich zugenommen, was die Intensität der Bemühungen auf diesem Gebiet widerspiegelt. In transgenen Mäusen wurden CreER-Fusionen konstitutiv unter einem CMV-Promotor (Feil *et al.*, 1996; Brocard *et al.*, 1997) und gewebespezifisch unter einem Wnt-Promotor im embryonalen Neuralrohr exprimiert (Danielian *et al.*, 1998), die jeweils lacZ-Reportergene aktivierten und so die Anwendbarkeit des Systems *in vivo* demonstrierten. Eine Anwendung der CreER-Fusion ist auch für das Immunsystem beschrieben, in der örtlich und zeitlich kontrollierte Rekombination eines Zielgens mit Hilfe des CD19-Promotors in B-Zellen erreicht wurde (Schwenk *et al.*, 1998). Auch in Keratinozyten der Haut bewies das System seine Einsatzfähigkeit (Vasioukhin *et al.*, 1999; Indra *et al.*, 1999). Anfang dieses Jahres wurde von der Gruppe um Pierre Chambon eine Maus etabliert, die durch Verwendung des leberspezifischen Promotors des $\alpha 1$ -Antitrypsin-Gens, in ca. 50% aller Hepatozyten Expression des Fusionsproteins ermöglichte (Imai *et al.*, 2000). Nach Verpaarung mit Reportermäusen und Induktion mit Tamoxifen hatten alle creER^{T1}-exprimierenden Hepatozyten das Zielgen rekombiniert. Im Unterschied zu dieser Arbeit haben wir die nächste Generation der ER-LBD (ER^{T2}) verwendet, die eine 3- bis 4-fach höhere Sensitivität zu 4-Hydroxy-Tamoxifen *in vitro* (Feil *et al.*, 1997) und eine 10-fach höhere Sensitivität *in vivo* (Indra *et al.*, 1999) aufweist. Beide mutierten LBD können nicht mehr durch den natürlichen Liganden 17 β -Östradiol aktiviert werden, so daß keine Hintergrund-Rekombination auftritt.. Wir haben in unserem Konstrukt erneut den Albumin-Promotor eingesetzt, der creER^{T2}-Expression in allen Hepatozyten ermöglichen sollte. 6 transgene Linien wurden nach Mikroinjektion unseres Alb-creER^{T2}-Konstrukts erhalten, von denen 2 das Fusionsprotein in Hepatozyten exprimieren (Abb. 34). Penetranz der Expression sowie Effizienz der Induktion, Rekombination von geflochten Zielgenen und letztendlich Tumorentstehung müssen in den nächsten Monaten analysiert werden. Hierzu wurden die beiden exprimierenden Linien mit Mäusen verpaart, die nach Tamoxifen-induzierter Rekombination EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) exprimieren, was sich leicht durch Fluoreszenzmikroskopie nachweisen und lokalisieren läßt. In unserer Gruppe wurde das creER^{T2}-Fusionsprotein *in vivo* schon erfolgreich unter einem Endothel-spezifischen Promotor (tie2) eingesetzt (Rainer Constien,

noch nicht publiziert), so daß begründete Hoffnung besteht Cre auf diesem Wege auch in Hepatozyten induzieren zu können.

VI. Zusammenfassung

Die Immunantwort gegen Selbst-Antigene kann einerseits zu schädlichen Autoimmunerkrankungen andererseits aber auch zu erwünschten Immunreaktionen gegen Tumore führen. Die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen scheint zwar eine entscheidende aber keine hinreichende Voraussetzung für die Entstehung von Antitumorimmunität oder Autoaggression zu sein.

Diese Situation zeigt sich in unserem Mausmodell für die Induktion einer Autoimmunreaktion gegen Lebergewebe. In diesem Modell ist neben der Aktivierung K^b-spezifischer T-Zellen auch eine bakterielle Infektion in der Leber notwendig, um eine **Autoaggression gegenüber K^b-exprimierenden Leberzellen** zu induzieren. Im ersten Teil der Arbeit sollte geklärt werden, ob es sich in diesem System um eine Autoaggression oder eine Immunantwort gegen bakterielle Antigene handelt.

Es konnte gezeigt werden, daß eine Entzündungsreaktion in der Leber, induziert durch CpG-haltige Oligodeoxynukleotide, ausreicht, um aktivierten K^b-spezifischen T-Zellen den antigenspezifischen Angriff auf Hepatozyten zu ermöglichen. Kreuzreaktivität mit bakteriellen Epitopen, ein Vorgang, der als molekulare Mimikry bezeichnet wird, konnte damit ausgeschlossen werden. IL-12 spielt beim CpG-ODN-vermittelten Effekt eine entscheidende Rolle. Der autoimmune Leberschaden ist transient und kann zwar kurzzeitig reinduziert und verlängert werden, nimmt aber keinen chronischen Verlauf an. Die CpG-ODN-vermittelte Entzündungsreaktion in der K^b-exprimierenden Leber ermöglicht außerdem die Aktivierung K^b-spezifischer T-Zellen und nachfolgende Autoaggression.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte ein Tumormodell geschaffen werden, daß es ermöglicht, die Bedeutung von Entzündungsreaktionen bei der Induktion von T-Zell-vermittelten Immunreaktionen gegen malignes (Leber-)Gewebe untersuchen zu können. Die bisher überwiegend verwendeten Transplantationstumore spiegeln die Situation humaner Primärtumore nur unzureichend wieder, da hier vollständig transformierte Tumorzellen als Zellsuspension ektopisch (meist subkutan) appliziert werden. Um auch die Entzündungsreaktion am Injektionsort zu vermeiden, sollte ein **autochthones (am Fundort gewachsen) Lebertumormodell** in der Maus generiert werden.

Hierzu wurde mit Hilfe des cre/loxP-Systems die Expression des großen T-Antigens (Tag) des SV40 als Onkogen in Hepatozyten induziert. Die Cre-Rekombinase-vermittelte Inversion einer mit loxP-Sequenzen flankierten invertierten Tag-Sequenz führte zur

Entwicklung von multifokalen Hepatozellulären Karzinomen innerhalb von sechs Monaten. Transformation war hepatozytenspezifisch und führte nicht zu Metastasierung in andere Organe.

Um die unphysiologische Situation herkömmlicher Onkogen-transgener Mäuse zu vermeiden, daß jede Zelle eines bestimmten Organs das Onkogen exprimiert und potentiell transformieren kann, sollte nur in einem Teil der Leberzellen Tag-Expression möglich sein. Dies sollte durch die Applikation der Cre-Rekombinase durch zwei unterschiedliche Methoden ermöglicht werden. Erstens konnte gezeigt werden, daß die Applikation von Liposomen, die cre-kodierendes Plasmid enthalten, zu partieller Rekombination eines geflochten Konstrukts in der Leber führt. Zweitens konnten zwei transgene Linien, die ein Fusionsprotein aus Cre und der Tamoxifen-induzierbaren mutierten Ligandbindedomäne des Östrogenrezeptors exprimieren, hergestellt werden.

In zukünftigen Arbeiten soll festgestellt werden, ob sich durch Applikation von Tamoxifen bzw. cre-Liposomen Lebertumore induzieren lassen. Damit wäre ein Maussystem geschaffen, das der klinischen Situation der Tumorentstehung näher ist als Transplantationstumore und das Etablieren immuntherapeutischer Strategien erlaubt.

VII. Literaturverzeichnis

- Abbas, A.K. (2000). Cellular and molecular immunology. 4. edition. W.B. Saunders Company.
- Abehsira-Amar, O., Gibert, M., Joliy, M., Theze, J., and Jankovic, D. L. (1992). IL-4 plays a dominant role in the differential development of Tho into Th1 and Th2 cells. *J Immunol* **148**, 3820-9.
- Aberer, E., Brunner, C., Suchanek, G., Klade, H., Barbour, A., Stanek, G., and Lassmann, H. (1989). Molecular mimicry and Lyme borreliosis: a shared antigenic determinant between *Borrelia burgdorferi* and human tissue [see comments]. *Ann Neurol* **26**, 732-7.
- Abrams, S. I., Hand, P. H., Tsang, K. Y., and Schlom, J. (1996). Mutant ras epitopes as targets for cancer vaccines. *Semin Oncol* **23**, 118-34.
- Adachi, M., Watanabe-Fukunaga, R., and Nagata, S. (1993). Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen gene of lpr mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 1756-60.
- Adachi, M., Suematsu, S., Kondo, T., Ogasawara, J., Tanaka, T., Yoshida, N., and Nagata, S. (1995). Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver. *Nat Genet* **11**, 294-300.
- Adams, T. E., Alpert, S., and Hanahan, D. (1987). Non-tolerance and autoantibodies to a transgenic self antigen expressed in pancreatic beta cells. *Nature* **325**, 223-8.
- Adams, J. M., and Cory, S. (1991). Transgenic models of tumor development. *Science* **254**, 1161-7.
- Afonso, L. C., Scharton, T. M., Vieira, L. Q., Wysocka, M., Trinchieri, G., and Scott, P. (1994). The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science* **263**, 235-7.
- Akagi, K., Sandig, V., Vooijs, M., Van der Valk, M., Giovannini, M., Strauss, M., and Berns, A. (1997). Cre-mediated somatic site-specific recombination in mice. *Nucleic Acids Res* **25**, 1766-73.
- Albert, M. L., Sauter, B., and Bhardwaj, N. (1998). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* **392**, 86-9.
- Alferink, J., Tafuri, A., Vestweber, D., Hallmann, R., Hammerling, G. J., and Arnold, B. (1998). Control of neonatal tolerance to tissue antigens by peripheral T cell trafficking. *Science* **282**, 1338-41.
- Alfrey, E. J., Most, D., Wang, X., Lee, L. K., Holm, B., Krieger, N. R., Sibley, R. K., Huie, P., and Dafoe, D. C. (1995). Interferon-gamma and interleukin-10 messenger RNA are up-regulated after orthotopic liver transplantation in tolerant rats: evidence for cytokine-mediated immune dysregulation. *Surgery* **118**, 399-404; discussion 404-5.
- Alino, S. F. (1997). Long-term expression of the human alpha1-antitrypsin gene in mice employing anionic and cationic liposome vector. *Biochem Pharmacol* **54**, 9-13.
- Ando, K., Guidotti, L. G., Cerny, A., Ishikawa, T., and Chisari, F. V. (1994). CTL access to tissue antigen is restricted *in vivo*. *J Immunol* **153**, 482-8.
- Arai, T., Hiromatsu, K., Kobayashi, N., Takano, M., Ishida, H., Nimura, Y., and Yoshikai, Y. (1995). IL-10 is involved in the protective effect of dibutyl cyclic adenosine monophosphate on endotoxin-induced inflammatory liver injury. *J Immunol* **155**, 5743-9.
- Arnold, B., Horstmann, U., Kuon, W., Burgert, H. G., Hammerling, G. J., and Kvist, S. (1985). Alloreactive cytolytic T-cell clones preferentially recognize conformational determinants on histocompatibility antigens: analysis with genetically engineered hybrid antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 7030-4.
- Atkinson, M. A., Bowman, M. A., Campbell, L., Darrow, B. L., Kaufman, D. L., and Maclaren, N. K. (1994). Cellular immunity to a determinant common to glutamate decarboxylase and coxsackie virus in insulin-dependent diabetes [see comments]. *J Clin Invest* **94**, 2125-9.
- Awwad, M., and North, R. J. (1990). Radiosensitive barrier to T-cell-mediated adoptive immunotherapy of established tumors. *Cancer Res* **50**, 2228-33.
- Bach, N., Thung S.N. and Schaffner F. (1992). The histological features of chronic hepatitis C and autoimmune chronic hepatitis: A comparative analysis. *Hepatology* **15**: 572-577.
- Bach, J. F. (1994). The multifactorial etiology of autoimmune diseases. *Clin Exp Rheumatol* **12 Suppl 11**, S5-8.
- Baggiolini, M. (1998). Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* **392**, 565-8.
- Bahler, D. W., Frelinger, J. G., Harwell, L. W., and Lord, E. M. (1987). Reduced tumorigenicity of a spontaneous mouse lung carcinoma following H-2 gene transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**,

4562-6.

- Ballas, Z. K., Rasmussen, W. L., and Krieg, A. M. (1996). Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J Immunol* **157**, 1840-5.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **18**, 767-811.
- Barker, C. F., and Billingham, R. E. (1967). The role of regional lymphatics in the skin homograft response. *Transplantation* **5**, Suppl:962-6.
- Barnd, D. L., Lan, M. S., Metzgar, R. S., and Finn, O. J. (1989). Specific, major histocompatibility complex-unrestricted recognition of tumor-associated mucins by human cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 7159-63.
- Barrett, J.C. (1992). Mechanisms of action of known human carcinogenesis. In: Vainio, H., Magee, P.N., McGregor, D.B. and McMichael, A.J. (Eds). Mechanisms of carcinogenesis in risk identification. International Agency for research on Cancer, Lyon 115-134.
- Becker, F. F. (1974). Hepatoma--nature's model tumor. A review. *Am J Pathol* **74**, 179-210.
- Becker, J. C., Czerny, C., and Brocker, E. B. (1994). Maintenance of clonal anergy by endogenously produced IL-10. *Int Immunol* **6**, 1605-12.
- Beer, D. G., and Pitot, H. C. (1989). Proto-oncogene activation during chemically induced hepatocarcinogenesis in rodents. *Mutat Res* **220**, 1-10.
- Bendelac, A., Rivera, M. N., Park, S. H., and Roark, J. H. (1997). Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu Rev Immunol* **15**, 535-62.
- Bendigs, S., Salzer, U., Lipford, G. B., Wagner, H., and Heeg, K. (1999). CpG-oligodeoxynucleotides co-stimulate primary T cells in the absence of antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* **29**, 1209-18.
- Bennett, S. R., Carbone, F. R., Karamalis, F., Flavell, R. A., Miller, J. F., and Heath, W. R. (1998). Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling [see comments]. *Nature* **393**, 478-80.
- Bennoun, M., Grimber, G., Couton, D., Seye, A., Molina, T., Briand, P., and Joulin, V. (1998). The amino-terminal region of SV40 large T antigen is sufficient to induce hepatic tumours in mice. *Oncogene* **17**, 1253-9.
- Berdanier, C. D. (1995). Diet, autoimmunity, and insulin-dependent diabetes mellitus: a controversy. *Proc Soc Exp Biol Med* **209**, 223-30.
- Berg, L. J., Fazekas de St. Groth, B., Ivars, F., Goodnow, C. C., Gilfillan, S., Garchon, H. J., and Davis, M. M. (1988). Expression of T-cell receptor alpha-chain genes in transgenic mice. *Mol Cell Biol* **8**, 5459-69.
- Berg, E. L., Robinson, M. K., Warnock, R. A., and Butcher, E. C. (1991). The human peripheral lymph node vascular addressin is a ligand for LECAM-1, the peripheral lymph node homing receptor. *J Cell Biol* **114**, 343-9.
- Bertolino, P., Heath, W. R., Hardy, C. L., Morahan, G., and Miller, J. F. (1995). Peripheral deletion of autoreactive CD8+ T cells in transgenic mice expressing H-2Kb in the liver. *Eur J Immunol* **25**, 1932-42.
- Bertolino, P., Trescol-Biemont, M. C., and Rabourdin-Combe, C. (1998). Hepatocytes induce functional activation of naive CD8+ T lymphocytes but fail to promote survival. *Eur J Immunol* **28**, 221-36.
- Bertolino, P., Trescol-Biemont, M. C., Thomas, J., de St Groth, B. F., Pihlgren, M., Marvel, J., and Rabourdin-Combe, C. (1999). Death by neglect as a deletional mechanism of peripheral tolerance. *Int Immunol* **11**, 1225-38.
- Bevilacqua M.P. (1983). Endothelial leukocyte adhesion molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **11**, 767-804.
- Bird, A.P. (1980). DNA-methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucl. Acid. Res.* **8**: 1499.
- Biron, C. A., Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P., and Salazar-Mather, T. P. (1999). Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* **17**, 189-220.
- Bissell, D. M., Wang, S. S., Jarnagin, W. R., and Roll, F. J. (1995). Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *J Clin Invest* **96**, 447-55.
- Blumberg, B. S. (1997). Hepatitis B virus, the vaccine, and the control of primary cancer of the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7121-5.

- Bluthmann, H., Kisielow, P., Uematsu, Y., Malissen, M., Krimpenfort, P., Berns, A., von Boehmer, H., and Steinmetz, M. (1988). T-cell-specific deletion of T-cell receptor transgenes allows functional rearrangement of endogenous alpha- and beta-genes. *Nature* **334**, 156-9.
- Bogdan, C., Rollinghoff, M., and Diefenbach, A. (2000). Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* **12**, 64-76.
- Boon, T., Van Pel, A., De Plaen, E., Chomez, P., Lurquin, C., Szikora, J. P., Sibille, C., Mariame, B., Van den Eynde, B., Lethe, B., and et al. (1989). Genes coding for T-cell-defined tumor transplantation antigens: point mutations, antigenic peptides, and subgenic expression. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **54**, 587-96.
- Boon, T., Gajewski, T. F., and Coulie, P. G. (1995). From defined human tumor antigens to effective immunization? *Immunol Today* **16**, 334-6.
- Boon, T., and van der Bruggen, P. (1996). Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J Exp Med* **183**, 725-9.
- Boussiotis, V. A., Gribben, J. G., Freeman, G. J., and Nadler, L. M. (1994). Blockade of the CD28 co-stimulatory pathway: a means to induce tolerance. *Curr Opin Immunol* **6**, 797-807.
- Bradley, M. K., Griffin, J. D., and Livingston, D. M. (1982). Relationship of oligomerization to enzymatic and DNA-binding properties of the SV40 large T antigen. *Cell* **28**, 125-34.
- Branda, R. F., Moore, A. L., Mathews, L., McCormack, J. J., and Zon, G. (1993). Immune stimulation by an antisense oligomer complementary to the rev gene of HIV-1. *Biochem Pharmacol* **45**, 2037-43.
- Bretscher, P., and Cohn, M. (1970). A theory of self-nonsel self discrimination. *Science* **169**, 1042-9.
- Brinster, R. L., Chen, H. Y., Trumbauer, M., Senear, A. W., Warren, R., and Palmiter, R. D. (1981). Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell* **27**, 223-31.
- Brinster, R. L., Chen, H. Y., Messing, A., van Dyke, T., Levine, A. J., and Palmiter, R. D. (1984). Transgenic mice harboring SV40 T-antigen genes develop characteristic brain tumors. *Cell* **37**, 367-79.
- Brocard, J., Warot, X., Wendling, O., Messaddeq, N., Vonesch, J. L., Chambon, P., and Metzger, D. (1997). Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14559-63.
- Brocard, J., Feil, R., Chambon, P., and Metzger, D. (1998). A chimeric Cre recombinase inducible by synthetic, but not by natural ligands of the glucocorticoid receptor. *Nucleic Acids Res* **26**, 4086-90.
- Brocke, S., Gaur, A., Piercy, C., Gautam, A., Gijbels, K., Fathman, C. G., and Steinman, L. (1993). Induction of relapsing paralysis in experimental autoimmune encephalomyelitis by bacterial superantigen. *Nature* **365**, 642-4.
- Brunner, K. T., Mauel, J., Cerottini, J. C., and Chapuis, B. (1968). Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51- Cr-labelled allogeneic target cells *in vitro*; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology* **14**, 181-96.
- Buchholz, F., Angrand, P. O., and Stewart, A. F. (1996). A simple assay to determine the functionality of Cre or FLP recombination targets in genomic manipulation constructs. *Nucleic Acids Res* **24**, 3118-9.
- Butcher, E. C., and Picker, L. J. (1996). Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* **272**, 60-6.
- Butel, J. S., and Jarvis, D. L. (1986a). The plasma-membrane-associated form of SV40 large tumor antigen: biochemical and biological properties. *Biochim Biophys Acta* **865**, 171-95.
- Butel, J. S. (1986b). SV40 large T-antigen: dual oncogene. *Cancer Surv* **5**, 343-65.
- Butel, J. S., Sepulveda, A. R., Finegold, M. J., and Woo, S. L. (1990). SV40 large T antigen directed by regulatory elements of the human alpha-1-antitrypsin gene. A transgenic mouse system that exhibits stages in liver carcinogenesis. *Intervirology* **31**, 85-100.
- Buzard, G. S. (1996). Studies of oncogene activation and tumor suppressor gene inactivation in normal and neoplastic rodent tissue. *Mutat Res* **365**, 43-58.
- Campbell, I. L., Wong, G. H., Schrader, J. W., and Harrison, L. C. (1985). Interferon-gamma enhances the expression of the major histocompatibility class I antigens on mouse pancreatic beta cells. *Diabetes* **34**, 1205-9.
- Campbell, I. L., Oxbrow, L., Koulmanda, M., and Harrison, L. C. (1988). IFN-gamma induces islet cell MHC antigens and enhances autoimmune, streptozotocin-induced diabetes in the mouse. *J Immunol* **140**, 1111-6.

- Campbell, J. M., Bacon, T. A., and Wickstrom, E. (1990). Oligodeoxynucleoside phosphorothioate stability in subcellular extracts, culture media, sera and cerebrospinal fluid. *J Biochem Biophys Methods* **20**, 259-67.
- Campbell, J. J., and Butcher, E. C. (2000). Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol* **12**, 336-41.
- Cardin, R. D., Brooks, J. W., Sarawar, S. R., and Doherty, P. C. (1996). Progressive loss of CD8+ T cell-mediated control of a gamma-herpesvirus in the absence of CD4+ T cells. *J Exp Med* **184**, 863-71.
- Carlow, D. A., Teh, S. J., van Oers, N. S., Miller, R. G., and Teh, H. S. (1992). Peripheral tolerance through clonal deletion of mature CD4-CD8+ T cells. *Int Immunol* **4**, 599-610.
- Carr, B.I., Starzl, T.E., Iwatsuki, S. *et al.*, (1991). Aggressive treatment for advance hepatocellular carcinoma (HCC): High response rates and prolonged survival. *Hepatology* **14**, 243.
- Carroll, M. C. (1998). The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu Rev Immunol* **16**, 545-68.
- Carswell, E.A., Wanebo, H.J., Old, L.J. and Boyse, E.A. (1970). Immunogenic properties of reticulum cell carcinoma of the SJL/J mice. *J. Natl. Cancer Inst.* **44**, 1281.
- Cartier, N., Miquerol, L., Tulliez, M., Lepetit, N., Levrat, F., Grimber, G., Briand, P., and Kahn, A. (1992). Diet-dependent carcinogenesis of pancreatic islets and liver in transgenic mice expressing oncogenes under the control of the L-type pyruvate kinase gene promoter. *Oncogene* **7**, 1413-22.
- Caspi, R. R. (1998). IL-12 in autoimmunity. *Clin Immunol Immunopathol* **88**, 4-13.
- Chace, J. H., Hooker, N. A., Mildenstein, K. L., Krieg, A. M., and Cowdery, J. S. (1997). Bacterial DNA-induced NK cell IFN-gamma production is dependent on macrophage secretion of IL-12. *Clin Immunol Immunopathol* **84**, 185-93.
- Chambers, C. A., and Allison, J. P. (1997). Co-stimulation in T cell responses. *Curr Opin Immunol* **9**, 396-404.
- Chang, J. T., Shevach, E. M., and Segal, B. M. (1999a). Regulation of interleukin (IL)-12 receptor beta2 subunit expression by endogenous IL-12: a critical step in the differentiation of pathogenic autoreactive T cells. *J Exp Med* **189**, 969-78.
- Chang, B. H., Liao, W., Li, L., Nakamuta, M., Mack, D., and Chan, L. (1999b). Liver-specific inactivation of the abetalipoproteinemia gene completely abrogates very low density lipoprotein/low density lipoprotein production in a viable conditional knockout mouse. *J Biol Chem* **274**, 6051-5.
- Chervonsky, A. V., Wang, Y., Wong, F. S., Visintin, I., Flavell, R. A., Janeway, C. A., Jr., and Matis, L. A. (1997). The role of Fas in autoimmune diabetes. *Cell* **89**, 17-24.
- Chisari, F. V., Klopchin, K., Moriyama, T., Pasquinelli, C., Dunsford, H. A., Sell, S., Pinkert, C. A., Brinster, R. L., and Palmiter, R. D. (1989). Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. *Cell* **59**, 1145-56.
- Chisari, F. V., and Ferrari, C. (1995). Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* **13**, 29-60.
- Choi, Y. W., Lee, I. C., and Ross, S. R. (1988). Requirement for the simian virus 40 small tumor antigen in tumorigenesis in transgenic mice. *Mol Cell Biol* **8**, 3382-90.
- Chu, R. S., Askew, D., Noss, E. H., Tobian, A., Krieg, A. M., and Harding, C. V. (1999). CpG oligodeoxynucleotides down-regulate macrophage class II MHC antigen processing. *J Immunol* **163**, 1188-94.
- Conrad, B., Weidmann, E., Trucco, G., Rudert, W. A., Behboo, R., Ricordi, C., Rodriguez-Rilo, H., Finegold, D., and Trucco, M. (1994). Evidence for superantigen involvement in insulin-dependent diabetes mellitus aetiology [see comments]. *Nature* **371**, 351-5.
- Constantinescu, C. S., Wysocka, M., Hilliard, B., Ventura, E. S., Lavi, E., Trinchieri, G., and Rostami, A. (1998). Antibodies against IL-12 prevent superantigen-induced and spontaneous relapses of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **161**, 5097-104.
- Constantini, F., Radice, G., Lee, J.J., Chada, K.K., Perry, W. and Son, H.J. (1989). Insertional mutations in transgenic mice. In: *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, Vol. 36, 159-169.
- Cope E.M. and Dilby S.A. (1990). Kupffer cell numbers during human development. *Clin. Exp. Immunol.* **81**, 485.
- Cope, A.P. (1996). Regulation of autoimmunity by proinflammatory cytokines. *Curr. Op. Immunol.*

- 10**, 669-676.
- Cope, A. P., Liblau, R. S., Yang, X. D., Congia, M., Laudanna, C., Schreiber, R. D., Probert, L., Kollias, G., and McDevitt, H. O. (1997). Chronic tumor necrosis factor alters T cell responses by attenuating T cell receptor signaling. *J Exp Med* **185**, 1573-84.
- Cory, S., and Adams, J. M. (1988). Transgenic mice and oncogenesis. *Annu Rev Immunol* **6**, 25-48.
- Cowdery, J. S., Chace, J. H., Yi, A. K., and Krieg, A. M. (1996). Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-gamma *in vivo* and increases the toxicity of lipopolysaccharides. *J Immunol* **156**, 4570-5.
- Cox, A. L., Skipper, J., Chen, Y., Henderson, R. A., Darrow, T. L., Shabanowitz, J., Engelhard, V. H., Hunt, D. F., and Slingluff, C. L., Jr. (1994). Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science* **264**, 716-9.
- Crepso, J., Blaya, C., Crespo, A., and Alino, S. F. (1996). Long-term expression of the human alpha1-antitrypsin gene in mice employing anionic and cationic liposome vectors. *Biochem Pharmacol* **51**, 1309-14.
- Crispe, I. N., and Mehal, W. Z. (1996). Strange brew: T cells in the liver. *Immunol Today* **17**, 522-5.
- Croft, M., Carter, L., Swain, S. L., and Dutton, R. W. (1994). Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations: reciprocal action of interleukin (IL)-4 and IL-12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles. *J Exp Med* **180**, 1715-28.
- Danielian, P. S., Muccino, D., Rowitch, D. H., Michael, S. K., and McMahon, A. P. (1998). Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen- inducible form of Cre recombinase. *Curr Biol* **8**, 1323-6.
- De Plaen, E., Lurquin, C., Van Pel, A., Mariame, B., Szikora, J. P., Wolfel, T., Sibille, C., Chomez, P., and Boon, T. (1988). Immunogenic (tum-) variants of mouse tumor P815: cloning of the gene of tum- antigen P91A and identification of the tum- mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 2274-8.
- De Plaen, E., Arden, K., Traversari, C., Gaforio, J. J., Szikora, J. P., De Smet, C., Brasseur, F., van der Bruggen, P., Lethe, B., Lurquin, C., and et al. (1994). Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics* **40**, 360-9.
- de Wit, T., Drabek, D., and Grosveld, F. (1998). Microinjection of cre recombinase RNA induces site-specific recombination of a transgene in mouse oocytes. *Nucleic Acids Res* **26**, 676-8.
- DeCaprio, J. A., Ludlow, J. W., Figge, J., Shew, J. Y., Huang, C. M., Lee, W. H., Marsilio, E., Paucha, E., and Livingston, D. M. (1988). SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* **54**, 275-83.
- Deng, G. M., Nilsson, I. M., Verdrengh, M., Collins, L. V., and Tarkowski, A. (1999). Intra-articularly localized bacterial DNA containing CpG motifs induces arthritis. *Nat Med* **5**, 702-5.
- Dianzani, U., and Malavasi, F. (1995). Lymphocyte adhesion to endothelium. *Crit Rev Immunol* **15**, 167-200.
- Dialynas, D.P., Quan, Z.S., Wall, K.A., Pierres, J., Quintans M.R. and Fitch F.W. (1983). Characterization of the murine T cell surface molecule, designated L3T4, identified by monoclonal antibody GK1.5: Similarity of L3T4 to the human LEU3T4 molecule. *J. Immunol.* **131**, 2445-2451.
- Disis, M. L., and Cheever, M. A. (1996). Oncogenic proteins as tumor antigens. *Curr Opin Immunol* **8**, 637-42.
- Drew, R. T., Boorman, G. A., Haseman, J. K., McConnell, E. E., Busey, W. M., and Moore, J. A. (1983). The effect of age and exposure duration on cancer induction by a known carcinogen in rats, mice, and hamsters. *Toxicol Appl Pharmacol* **68**, 120-30.
- Dubois, N., Bennoun, M., Allemand, I., Molina, T., Grimber, G., Daudet-Monsac, M., Abelanet, R., and Briand, P. (1991). Time-course development of differentiated hepatocarcinoma and lung metastasis in transgenic mice. *J Hepatol* **13**, 227-39.
- Dutton, R. W., Bradley, L. M., and Swain, S. L. (1998). T cell memory. *Annu Rev Immunol* **16**, 201-23.
- Dyer, K. R., and Messing, A. (1989). Metal-inducible pathology in the liver, pancreas, and kidney of transgenic mice expressing SV40 early region genes. *Am J Pathol* **135**, 401-10.
- Eggink, H.F., Houthoff H.J., Huitema S., Gips, C.H. and Poppema S. (1982). Cellular and humoral immune reactions in chronic active liver disease. I. Lymphocyte subsets in liver biopsies of patients with untreated idiopathic autoimmune hepatitis, chronic active hepatitis B and primary biliary cirrhosis. *Clin. Exp. Immunol.* **50**: 17-24.
- Emmerich, K. H., and Norpoth, K. (1981). Malignant tumors after chronic exposure to vinyl chloride.

- J Cancer Res Clin Oncol* **102**, 1-11.
- Evans, C., Bauer, S., Grubert, T., Brucker, C., Baur, S., Heeg, K., Wagner, H., and Lipford, G. B. (1996). HLA-A2-restricted peripheral blood cytolytic T lymphocyte response to HPV type 16 proteins E6 and E7 from patients with neoplastic cervical lesions. *Cancer Immunol Immunother* **42**, 151-60.
- Faas, S. J., Pan, S., Pinkert, C. A., Brinster, R. L., and Knowles, B. B. (1987). Simian virus 40 (SV40)-transgenic mice that develop tumors are specifically tolerant to SV40 T antigen. *J Exp Med* **165**, 417-27.
- Falib, D., Briner, T. J., Sunshine, G. H., Bourque, C. R., Luqman, M., Gefter, M. L., and Kamradt, T. (1996). Peripheral tolerance in T cell receptor-transgenic mice: evidence for T cell anergy [published erratum appears in *Eur J Immunol* 1996 Apr;26(4):966]. *Eur J Immunol* **26**, 130-5.
- Falcone, M., Yeung, B., Tucker, L., Rodriguez, E., and Sarvetnick, N. (1999a). A defect in interleukin 12-induced activation and interferon gamma secretion of peripheral natural killer T cells in nonobese diabetic mice suggests new pathogenic mechanisms for insulin-dependent diabetes mellitus. *J Exp Med* **190**, 963-72.
- Falcone, M., and Sarvetnick, N. (1999b). Cytokines that regulate autoimmune responses. *Curr Opin Immunol* **11**, 670-6.
- Farber, E. (1992). On cells of origin of liver cell cancer. In: Sirica, A.E. (Ed.). *The role of cell types in hepatocarcinogenesis*. CRC Press Boca Raton, FL 1-28.
- Fearon, D. T., and Locksley, R. M. (1996). The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* **272**, 50-3.
- Feil, R., Brocard, J., Mascrez, B., LeMeur, M., Metzger, D., and Chambon, P. (1996). Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10887-90.
- Feil, R., Wagner, J., Metzger, D., and Chambon, P. (1997). Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun* **237**, 752-7.
- Ferber, I., Schonrich, G., Schenkel, J., Mellor, A. L., Hammerling, G. J., and Arnold, B. (1994). Levels of peripheral T cell tolerance induced by different doses of tolerogen. *Science* **263**, 674-6.
- Ferkol, T., Lindberg, G. L., Chen, J., Perales, J. C., Crawford, D. R., Ratnoff, O. D., and Hanson, R. W. (1993). Regulation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase/human factor IX gene introduced into the livers of adult rats by receptor-mediated gene transfer. *Faseb J* **7**, 1081-91.
- Forster, I., Hirose, R., Arbeit, J. M., Clausen, B. E., and Hanahan, D. (1995). Limited capacity for tolerization of CD4+ T cells specific for a pancreatic beta cell neo-antigen. *Immunity* **2**, 573-85.
- Fox, N., Croke, R., Hwang, L. H., Schibler, U., Knowles, B. B., and Solter, D. (1989). Metastatic hibernomas in transgenic mice expressing an alpha-amylase- SV40 T antigen hybrid gene. *Science* **244**, 460-3.
- Freeman, G. J., Freedman, A. S., Segil, J. M., Lee, G., Whitman, J. F., and Nadler, L. M. (1989). B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells. *J Immunol* **143**, 2714-22.
- Frey, J.R., Wenk, P. (1957). Experimental studie on the pathogenesis on contact eczema in the guinea pig. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **11**, 81-94.
- Fujinami, R. S., and Oldstone, M. B. (1985). Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* **230**, 1043-5.
- Furlan, R., Poliani, P. L., Galbiati, F., Bergami, A., Grimaldi, L. M., Comi, G., Adorini, L., and Martino, G. (1998). Central nervous system delivery of interleukin 4 by a nonreplicative herpes simplex type 1 viral vector ameliorates autoimmune demyelination. *Hum Gene Ther* **9**, 2605-17.
- Galbraith, W. M., Hobson, W. C., Giclas, P. C., Schechter, P. J., and Agrawal, S. (1994). Complement activation and hemodynamic changes following intravenous administration of phosphorothioate oligonucleotides in the monkey. *Antisense Res Dev* **4**, 201-6.
- Gallimore A., Glithero A., Godkin A., Tissot A.C., Pluckthun A., Elliott T., Hengertner H., Zinkernagel R. (1998). Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *J. Exp. Med.* **187**, 1383-1393.
- Gamble, D. R. (1980). The epidemiology of insulin dependent diabetes with particular reference to the relationship of virus infection to its etiology. *Epidemiol Rev* **2**, 49-70.
- Ganss, R., and Hanahan, D. (1998). Tumor microenvironment can restrict the effectiveness of activated antitumor lymphocytes. *Cancer Res* **58**, 4673-81.

- Ganss, R., Limmer, A., Sacher, T., Arnold, B., and Hammerling, G. J. (1999). Autoaggression and tumor rejection: it takes more than self-specific T- cell activation. *Immunol Rev* **169**, 263-72.
- Ganter, U., Arcone, R., Toniatti, C., Morrone, G., and Ciliberto, G. (1989). Dual control of C-reactive protein gene expression by interleukin-1 and interleukin-6. *Embo J* **8**, 3773-9.
- Gantner, F., Leist, M., Kusters, S., Vogt, K., Volk, H. D., and Tiegs, G. (1996). T cell stimulus-induced crosstalk between lymphocytes and liver macrophages results in augmented cytokine release. *Exp Cell Res* **229**, 137-46.
- Garrick, D., Fiering, S., Martin, D. I., and Whitelaw, E. (1998). Repeat-induced gene silencing in mammals [see comments]. *Nat Genet* **18**, 56-9.
- Garrido, F., Ruiz-Cabello, F., Cabrera, T., Perez-Villar, J. J., Lopez-Botet, M., Duggan-Keen, M., and Stern, P. L. (1997). Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* **18**, 89-95.
- Gazzinelli, R. T., Wysocka, M., Hieny, S., Schariton-Kersten, T., Cheever, A., Kuhn, R., Muller, W., Trinchieri, G., and Sher, A. (1996). In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF- alpha. *J Immunol* **157**, 798-805.
- Geiger, T., Gooding, L. R., and Flavell, R. A. (1992). T-cell responsiveness to an oncogenic peripheral protein and spontaneous autoimmunity in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2985-9.
- Geiger, T., Soldevila, G., and Flavell, R. A. (1993). T cells are responsive to the simian virus 40 large tumor antigen transgenically expressed in pancreatic islets. *J Immunol* **151**, 7030-7.
- Germann, T., Szeliga, J., Hess, H., Storkel, S., Podlaski, F. J., Gately, M. K., Schmitt, E., and Rude, E. (1995). Administration of interleukin 12 in combination with type II collagen induces severe arthritis in DBA/1 mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4823-7.
- Gewurz, H., Zhang, X. H., and Lint, T. F. (1995). Structure and function of the pentraxins. *Curr Opin Immunol* **7**, 54-64.
- Gilliland, B. and Manik, M. (1986). Ankylosing spondylitis and Reiter's syndrome. In: *Harrison's Principles of internal medicine*. Ed. Harrison, T.R. 10th Ed. McGraw Hill, New York 1986-1988.
- Gjertsen, M. K., Bakka, A., Breivik, J., Saeterdal, I., Solheim, B. G., Soreide, O., Thorsby, E., and Gaudernack, G. (1995). Vaccination with mutant ras peptides and induction of T-cell responsiveness in pancreatic carcinoma patients carrying the corresponding RAS mutation. *Lancet* **346**, 1399-400.
- Glennie, M. J., and Johnson, P. W. (2000). Clinical trials of antibody therapy. *Immunol Today* **21**, 403-10.
- Gold, P., Freedman, S.O. (1965). Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J. Exp. Med.* **121**, 439-462.
- Goldenberg, D. M., Larson, S. M., Reisfeld, R. A., and Schlom, J. (1995). Targeting cancer with radiolabeled antibodies. *Immunol Today* **16**, 261-4.
- Gooding, L. R., and O'Connell, K. A. (1983). Recognition by cytotoxic T lymphocytes of cells expressing fragments of the SV40 tumor antigen. *J Immunol* **131**, 2580-6.
- Gordon, J. W., Scangos, G. A., Plotkin, D. J., Barbosa, J. A., and Ruddle, F. H. (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 7380-4.
- Green, E. A., Eynon, E. E., and Flavell, R. A. (1998). Local expression of TNFalpha in neonatal NOD mice promotes diabetes by enhancing presentation of islet antigens. *Immunity* **9**, 733-43.
- Greenblatt, M. S., Bennett, W. P., Hollstein, M., and Harris, C. C. (1994). Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* **54**, 4855-78.
- Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Lohden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., PfizenmAutoimmunerkrankungen, K., and et al. (1995). The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* **83**, 793-802.
- Grewal, I. S., Grewal, K. D., Wong, F. S., Picarella, D. E., Janeway, C. A., Jr., and Flavell, R. A. (1996). Local expression of transgene encoded TNF alpha in islets prevents autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice by preventing the development of auto-reactive islet-specific T cells [see comments]. *J Exp Med* **184**, 1963-74.
- Gu, H., Zou, Y. R., and Rajewsky, K. (1993). Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting.

- Cell* **73**, 1155-64.
- Gu, H., Marth, J. D., Orban, P. C., Mossmann, H., and Rajewsky, K. (1994). Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting [see comments]. *Science* **265**, 103-6.
- Gulubova, M. V. (1998). Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in the liver of patients with extrahepatic cholestasis. *Acta Histochem* **100**, 59-74.
- Haas, G. G., Jr., D'Cruz, O. J., and De Bault, L. E. (1988). Distribution of human leukocyte antigen-ABC and -D/DR antigens in the unfixed human testis. *Am J Reprod Immunol Microbiol* **18**, 47-51.
- Hahn, W. C., Counter, C. M., Lundberg, A. S., Beijersbergen, R. L., Brooks, M. W., and Weinberg, R. A. (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements [see comments]. *Nature* **400**, 464-8.
- Hahne, M., Rimoldi, D., Schroter, M., Romero, P., Schreier, M., French, L. E., Schneider, P., Bornand, T., Fontana, A., Lienard, D., Cerottini, J., and Tschopp, J. (1996). Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape [see comments]. *Science* **274**, 1363-6.
- Hallahan, D. E., and Virudachalam, S. (1997). Intercellular adhesion molecule 1 knockout abrogates radiation induced pulmonary inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6432-7.
- Halpern, M. D., Kurlander, R. J., and Pisetsky, D. S. (1996). Bacterial DNA induces murine interferon-gamma production by stimulation of interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha. *Cell Immunol* **167**, 72-8.
- Hamilton, D. L., and Abremski, K. (1984). Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synthesis of two lox sites. *J Mol Biol* **178**, 481-6.
- Hammerling G.J., Rusch E., Tada N., Kimura S., Hammerling U. (1982). Localization of allodeterminants on H-2Kb antigens determined with monoclonal antibodies and H-2 mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79**, 4737-4741.
- Hammerling, G. J., Vogt, A. B., and Kropshofer, H. (1999). Antigen processing and presentation--towards the millennium. *Immunol Rev* **172**, 5-9.
- Hanahan, D. (1985). Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature* **315**, 115-22.
- Hanahan, D. (1988). Dissecting multistep tumorigenesis in transgenic mice. *Annu Rev Genet* **22**, 479-519.
- Hanahan, D., Christofori, G., Naik, P., and Arbeit, J. (1996). Transgenic mouse models of tumour angiogenesis: the angiogenic switch, its molecular controls, and prospects for preclinical therapeutic models. *Eur J Cancer* **32A**, 2386-93.
- Hanahan, D. (1998). Peripheral-antigen-expressing cells in thymic medulla: factors in self-tolerance and autoimmunity. *Curr Opin Immunol* **10**, 656-62.
- Harbers, K., Jahner, D., and Jaenisch, R. (1981). Microinjection of cloned retroviral genomes into mouse zygotes: integration and expression in the animal. *Nature* **293**, 540-2.
- Harty, J. T., Lenz, L. L., and Bevan, M. J. (1996). Primary and secondary immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Curr Opin Immunol* **8**, 526-30.
- Heath, W. R., and Carbone, F. R. (1999). Cytotoxic T lymphocyte activation by cross-priming. *Curr Opin Immunol* **11**, 314-8.
- Heike, M., Blachere, N. E., and Srivastava, P. K. (1994). Protective cellular immunity against a spontaneous mammary carcinoma from ras transgenic mice. *Immunobiology* **190**, 411-23.
- Henry, S. P., Monteith, D., and Levin, A. A. (1997a). Antisense oligonucleotide inhibitors for the treatment of cancer: 2. Toxicological properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Anticancer Drug Des* **12**, 395-408.
- Henry, S. P., Giclas, P. C., Leeds, J., Pangburn, M., Auletta, C., Levin, A. A., and Kornbrust, D. J. (1997b). Activation of the alternative pathway of complement by a phosphorothioate oligonucleotide: potential mechanism of action. *J Pharmacol Exp Ther* **281**, 810-6.
- Hermans, I. F., Daish, A., Yang, J., Ritchie, D. S., and Ronchese, F. (1998). Antigen expressed on tumor cells fails to elicit an immune response, even in the presence of increased numbers of tumor-specific cytotoxic T lymphocyte precursors. *Cancer Res* **58**, 3909-17.
- Hino, O., Kitagawa T., Nomura, K., Ohtake, K., Furuta, Y. and Aizawa, S. (1989). Sequential morphological observation of hepatocarcinogenesis in transgenic mice of albumin-promoter-SV40 large T antigen gene. *Proc. Jap. Cancer Assoc.* **48**, 49.

- Hoke, G. D., Draper, K., Freier, S. M., Gonzalez, C., Driver, V. B., Zounes, M. C., and Ecker, D. J. (1991). Effects of phosphorothioate capping on antisense oligonucleotide stability, hybridization and antiviral efficacy versus herpes simplex virus infection. *Nucleic Acids Res* **19**, 5743-8.
- Holda, J. H., MAutoimmunerkrankungenr, T., and Claman, H. N. (1986). Natural suppressor activity in graft-vs-host spleen and normal bone marrow is augmented by IL 2 and interferon-gamma. *J Immunol* **137**, 3538-43.
- Holda, J. H., MAutoimmunerkrankungenr, T., and Claman, H. N. (1988). Evidence that IFN-gamma is responsible for natural suppressor activity in GVHD spleen and normal bone marrow. *Transplantation* **45**, 772-7.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Harris, C. C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* **253**, 49-53.
- Hooper, M. L. (1998). Tumour suppressor gene mutations in humans and mice: parallels and contrasts. *Embo J* **17**, 6783-9.
- Horiguchi, S., Petersson, M., Nakazawa, T., Kanda, M., Zea, A. H., Ochoa, A. C., and Kiessling, R. (1999). Primary chemically induced tumors induce profound immunosuppression concomitant with apoptosis and alterations in signal transduction in T cells and NK cells. *Cancer Res* **59**, 2950-6.
- Horwitz, M. S., Evans, C. F., McGavern, D. B., Rodriguez, M., and Oldstone, M. B. (1997). Primary demyelination in transgenic mice expressing interferon-gamma. *Nat Med* **3**, 1037-41.
- Horwitz, M. S., Bradley, L. M., Harbertson, J., Krah, T., Lee, J., and Sarvetnick, N. (1998). Diabetes induced by Cocksackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry [see comments]. *Nat Med* **4**, 781-5.
- Houghton, A. N. (1994). Cancer antigens: immune recognition of self and altered self [comment]. *J Exp Med* **180**, 1-4.
- Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O'Garra, A., and Murphy, K. M. (1993). Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria- induced macrophages [see comments]. *Science* **260**, 547-9.
- Hu, J., Kindsvogel, W., Busby, S., Bailey, M. C., Shi, Y. Y., and Greenberg, P. D. (1993). An evaluation of the potential to use tumor-associated antigens as targets for antitumor T cell therapy using transgenic mice expressing a retroviral tumor antigen in normal lymphoid tissues. *J Exp Med* **177**, 1681-90.
- Hua, C., Boyer, C., Buferne, M., and Schmitt-Verhulst, A. M. (1986). Monoclonal antibodies against an H-2Kb-specific cytotoxic T cell clone detect several clone-specific molecules. *J Immunol* **136**, 1937-44.
- Huang, L., and Crispe, I. N. (1993). Superantigen-driven peripheral deletion of T cells. Apoptosis occurs in cells that have lost the alpha/beta T cell receptor. *J Immunol* **151**, 1844-51.
- Huang, L., Sye, K., and Crispe, I. N. (1994a). Proliferation and apoptosis of B220+CD4-CD8-TCR alpha beta intermediate T cells in the liver of normal adult mice: implication for lpr pathogenesis. *Int Immunol* **6**, 533-40.
- Huang, L., Soldevila, G., Leeker, M., Flavell, R., and Crispe, I. N. (1994b). The liver eliminates T cells undergoing antigen-triggered apoptosis *in vivo*. *Immunity* **1**, 741-9.
- Huchet, R., Bruley-Rosset, M., Mathiot, C., Grandjon, D., and Halle-Pannenko, O. (1993). Involvement of IFN-gamma and transforming growth factor-beta in graft- vs-host reaction-associated immunosuppression. *J Immunol* **150**, 2517-24.
- Hue, I., Trucy, J., McCoy, C., Couez, D., Malissen, B., and Malissen, M. (1990). A novel type of aberrant T cell receptor alpha-chain gene rearrangement. Implications for allelic exclusion and the V-J recombination process. *J Immunol* **144**, 4410-9.
- Hursting, S. D. (1997). Experimental models of gene-environment interaction for cancer chemoprevention studies. *Curr Opin Oncol* **9**, 487-91.
- Husmann, L. A., and Bevan, M. J. (1988). Cooperation between helper T cells and cytotoxic T lymphocyte precursors. *Ann N Y Acad Sci* **532**, 158-69.
- IARC (1987a). International Agency for Research on Cancer, IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Overall Evaluations of carcinogenicity: An updating of IARC Monographs, Suppl. 7, Vol 1-42, IARC Lyon, France, 83-87.
- IARC (1987b). International Agency for Research on Cancer, IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Hepatitis virus, Vol 59, IARC Lyon, France, 373-376.
- IARC (1994). International Agency for Research on Cancer, IARC Monographs on the evaluation of

- carcinogenic risks to humans. Overall Evaluations of carcinogenicity: An updating of IARC Monographs, Suppl. 7, Vol 1-42, IARC Lyon, France, 83-87.
- Imai, Y., Singer, M. S., Fennie, C., Lasky, L. A., and Rosen, S. D. (1991). Identification of a carbohydrate-based endothelial ligand for a lymphocyte homing receptor. *J Cell Biol* **113**, 1213-21.
- Imai, T., Chambon, P., and Metzger, D. (2000). Inducible site-specific somatic mutagenesis in mouse hepatocytes. *Genesis* **26**, 147-8.
- Indra, A. K., Warot, X., Brocard, J., Bornert, J. M., Xiao, J. H., Chambon, P., and Metzger, D. (1999). Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen- inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res* **27**, 4324-7.
- Isaka, F., Ishibashi, M., Taki, W., Hashimoto, N., Nakanishi, S., and Kageyama, R. (1999). Ectopic expression of the bHLH gene Math1 disturbs neural development. *Eur J Neurosci* **11**, 2582-8.
- Issekutz, T. B. (1990). Effects of six different cytokines on lymphocyte adherence to microvascular endothelium and *in vivo* lymphocyte migration in the rat. *J Immunol* **144**, 2140-6.
- Jager, E., Ringhoffer, M., Karbach, J., Arand, M., Oesch, F., and Knuth, A. (1996). Inverse relationship of melanocyte differentiation antigen expression in melanoma tissues and CD8+ cytotoxic-T-cell responses: evidence for immunoselection of antigen-loss variants *in vivo*. *Int J Cancer* **66**, 470-6.
- Jain, R. K., and Baxter, L. T. (1988). Mechanisms of heterogeneous distribution of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors: significance of elevated interstitial pressure. *Cancer Res* **48**, 7022-32.
- Janeway, C. A., Jr., Conrad, P. J., Lerner, E. A., Babich, J., Wettstein, P., and Murphy, D. B. (1984). Monoclonal antibodies specific for Ia glycoproteins raised by immunization with activated T cells: possible role of T cellbound Ia antigens as targets of immunoregulatory T cells. *J Immunol* **132**, 662-7.
- Janeway, C. A., Jr. (1992). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* **13**, 11-6.
- Jardetzky, T. S., Lane, W. S., Robinson, R. A., Madden, D. R., and Wiley, D. C. (1991). Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature* **353**, 326-9.
- Johnson, S. (1968). The effect of thymectomy and of the dose of 3-methylcholanthrene on the induction and antigenic properties of sarcomas in C56Bl mice. *Br J Cancer* **22**, 93-104.
- Jolicoeur, C., Hanahan, D., and Smith, K. M. (1994). T-cell tolerance toward a transgenic beta-cell antigen and transcription of endogenous pancreatic genes in thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 6707-11.
- June, C. H., Bluestone, J. A., Nadler, L. M., and Thompson, C. B. (1994). The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today* **15**, 321-31.
- Kafri, T., Morgan, D., Krah, T., Sarvetnick, N., Sherman, L., and Verma, I. (1998). Cellular immune response to adenoviral vector infected cells does not require de novo viral gene expression: implications for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11377-82.
- Kagi, D., Vignaux, F., Ledermann, B., Burki, K., Depraetere, V., Nagata, S., Hengartner, H., and Golstein, P. (1994). Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* **265**, 528-30.
- Kane, L. P., Lin, J., and Weiss, A. (2000). Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr Opin Immunol* **12**, 242-9.
- Kaneda, Y., Iwai, K., and Uchida, T. (1989). Increased expression of DNA cointroduced with nuclear protein in adult rat liver. *Science* **243**, 375-8.
- Kappler, J. W., Wade, T., White, J., Kushnir, E., Blackman, M., Bill, J., Roehm, N., and Marrack, P. (1987). A T cell receptor V beta segment that imparts reactivity to a class II major histocompatibility complex product. *Cell* **49**, 263-71.
- Kappler, J. W., Roehm, N., and Marrack, P. (1987). T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* **49**, 273-80.
- Kawabe, Y., and Ochi, A. (1991). Programmed cell death and extrathymic reduction of Vbeta8+ CD4+ T cells in mice tolerant to Staphylococcus aureus enterotoxin B [see comments]. *Nature* **349**, 245-8.
- Kearney, E. R., Pape, K. A., Loh, D. Y., and Jenkins, M. K. (1994). Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction *in vivo*. *Immunity* **1**, 327-39.

- Keene, J. A., and Forman, J. (1982). Helper activity is required for the *in vivo* generation of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* **155**, 768-82.
- Kellendonk, C., Tronche, F., Casanova, E., Anlag, K., Opherke, C., and Schutz, G. (1999). Inducible site-specific recombination in the brain. *J Mol Biol* **285**, 175-82.
- Kew, M. C. (1986). The development of hepatocellular cancer in humans. *Cancer Surv* **5**, 719-39.
- Kim, C. M., Koike, K., Saito, I., Miyamura, T., and Jay, G. (1991). HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* **351**, 317-20.
- King, C., Davies, J., Mueller, R., Lee, M. S., Krah, T., Yeung, B., O'Connor, E., and Sarvetnick, N. (1998). TGF-beta1 alters APC preference, polarizing islet antigen responses toward a Th2 phenotype. *Immunity* **8**, 601-13.
- Kisielow, P., Teh, H. S., Bluthmann, H., and von Boehmer, H. (1988). Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. *Nature* **335**, 730-3.
- Kisielow, P., Bluthmann, H., Staerz, U. D., Steinmetz, M., and von Boehmer, H. (1988). Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. *Nature* **333**, 742-6.
- Klein, G., Sjoegren, H.O., Klein, E. and Hellström, E. (1960). Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host. *Cancer Res.* **20**, 1561-1572.
- Klein, L., Klein, T., Ruther, U., and Kyewski, B. (1998). CD4 T cell tolerance to human C-reactive protein, an inducible serum protein, is mediated by medullary thymic epithelium. *J Exp Med* **188**, 5-16.
- Klein, L., Klugmann, M., Nave, K. A., Tuohy, V. K., and Kyewski, B. (2000). Shaping of the autoreactive T-cell repertoire by a splice variant of self protein expressed in thymic epithelial cells [see comments]. *Nat Med* **6**, 56-61.
- Klinman, D. M., Yamshchikov, G., and Ishigatsubo, Y. (1997). Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines. *J Immunol* **158**, 3635-9.
- Klockmann, U., and Deppert, W. (1983). Acylated simian virus 40 large T-antigen: a new subclass associated with a detergent-resistant lamina of the plasma membrane. *Embo J* **2**, 1151-7.
- Knobloch, M., Schonrich, G., Schenkel, J., Malissen, M., Malissen, B., Schmitt-Verhulst, A. M., Hammerling, G. J., and Arnold, B. (1992). T cell activation and thymic tolerance induction require different adhesion intensities of the CD8 co-receptor. *Int Immunol* **4**, 1169-74.
- Knolle, P., Schlaak, J., Uhrig, A., Kempf, P., Meyer zum Buschenfelde, K. H., and Gerken, G. (1995a). Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *J Hepatol* **22**, 226-9.
- Knolle, P., Lohr, H., Treichel, U., Dienes, H. P., Lohse, A., Schlaack, J., and Gerken, G. (1995b). Parenchymal and nonparenchymal liver cells and their interaction in the local immune response. *Z Gastroenterol* **33**, 613-20.
- Kolb-Bachofen, V., Schlepper-Schafer, J., Roos, P., Hulsmann, D., and Kolb, H. (1984). GalNAc/Gal-specific rat liver lectins: their role in cellular recognition. *Biol Cell* **51**, 219-26.
- Kondo, T., Suda, T., Fukuyama, H., Adachi, M., and Nagata, S. (1997). Essential roles of the Fas ligand in the development of hepatitis [see comments]. *Nat Med* **3**, 409-13.
- Krakowski, M., and Owens, T. (1996). Interferon-gamma confers resistance to experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol* **26**, 1641-6.
- Krawitt, E. L. (1996). Autoimmune hepatitis [see comments]. *N Engl J Med* **334**, 897-903.
- Krieg, A. M., Yi, A. K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretzky, G. A., and Klinman, D. M. (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* **374**, 546-9.
- Krieg, A. M., Love-Homan, L., Yi, A. K., and Harty, J. T. (1998). CpG DNA induces sustained IL-12 expression *in vivo* and resistance to *Listeria monocytogenes* challenge. *J Immunol* **161**, 2428-34.
- Kumar, V., and Sercarz, E. (1998). Induction or protection from experimental autoimmune encephalomyelitis depends on the cytokine secretion profile of TCR peptide-specific regulatory CD4 T cells. *J Immunol* **161**, 6585-91.
- Kurts, C., Heath, W. R., Carbone, F. R., Allison, J., Miller, J. F., and Kosaka, H. (1996). Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens *in vivo*. *J Exp Med* **184**, 923-30.
- Kurts, C., Kosaka, H., Carbone, F. R., Miller, J. F., and Heath, W. R. (1997). Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J Exp*

- Med* **186**, 239-45.
- Kurtzke, J. F. (1993). Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection [published erratum appears in *Clin Microbiol Rev* 1994 Jan;7(1):141]. *Clin Microbiol Rev* **6**, 382-427.
- Kusters, S., Tiegs, G., Alexopoulou, L., Pasparakis, M., Douni, E., Kunstle, G., Bluethmann, H., Wendel, A., PfizenmAutoimmunerkrankungen, K., Kollias, G., and Grell, M. (1997). *In vivo* evidence for a functional role of both tumor necrosis factor (TNF) receptors and transmembrane TNF in experimental hepatitis. *Eur J Immunol* **27**, 2870-5.
- Kvale, D., and Brandtzaeg, P. (1993). Immune modulation of adhesion molecules ICAM-1 (CD54) and LFA-3 (CD58) in human hepatocytic cell lines. *J Hepatol* **17**, 347-52.
- Kyburz, D., Aichele, P., Speiser, D. E., Hengartner, H., Zinkernagel, R. M., and Pircher, H. (1993). T cell immunity after a viral infection versus T cell tolerance induced by soluble viral peptides. *Eur J Immunol* **23**, 1956-62.
- Laird, P. W., Zijderfeld, A., Linders, K., Rudnicki, M. A., Jaenisch, R., and Berns, A. (1991). Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res* **19**, 4293.
- Lafferty, K. J., and Cunningham, A. J. (1975). A new analysis of allogeneic interactions. *Aust J Exp Biol Med Sci* **53**, 27-42.
- Lakso, M., Sauer, B., Mosinger, B., Jr., Lee, E. J., Manning, R. W., Yu, S. H., Mulder, K. L., and Westphal, H. (1992). Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6232-6.
- Lakso, M., Pichel, J. G., Gorman, J. R., Sauer, B., Okamoto, Y., Lee, E., Alt, F. W., and Westphal, H. (1996). Efficient *in vivo* manipulation of mouse genomic sequences at the zygote stage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5860-5.
- Lam, K. P., and Rajewsky, K. (1998). Rapid elimination of mature autoreactive B cells demonstrated by Cre- induced change in B cell antigen receptor specificity *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13171-5.
- Lamb, J. R., Skidmore, B. J., Green, N., Chiller, J. M., and Feldmann, M. (1983). Induction of tolerance in influenza virus-immune T lymphocyte clones with synthetic peptides of influenza hemagglutinin. *J Exp Med* **157**, 1434-47.
- Lamont, A. G., and Adorini, L. (1996). IL-12: a key cytokine in immune regulation. *Immunol Today* **17**, 214-7.
- Larkin, J., Clayton, M., Sun, B., Perchonock, C. E., Morgan, J. L., Siracusa, L. D., Michaels, F. H., and Feitelson, M. A. (1999). Hepatitis B virus transgenic mouse model of chronic liver disease. *Nat Med* **5**, 907-12.
- Ledbetter, J. A., and Herzenberg, L. A. (1979). Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens. *Immunol Rev* **47**, 63-90.
- Ledley, F. D. (1995). Nonviral gene therapy: the promise of genes as pharmaceutical products. *Hum Gene Ther* **6**, 1129-44.
- Lee, Y. H., Sauer, B., Johnson, P. F., and Gonzalez, F. J. (1997). Disruption of the c/ebp alpha gene in adult mouse liver. *Mol Cell Biol* **17**, 6014-22.
- Legendre, V., Boyer, C., Guerder, S., Arnold, B., Hammerling, G., and Schmitt-Verhulst, A. M. (1999). Selection of phenotypically distinct NK1.1+ T cells upon antigen expression in the thymus or in the liver. *Eur J Immunol* **29**, 2330-43.
- Lehmann, P. V., Forsthuber, T., Miller, A., and Sercarz, E. E. (1992). Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature* **358**, 155-7.
- Leist, M., Gantner, F., Jilg, S., and Wendel, A. (1995). Activation of the 55 kDa TNF receptor is necessary and sufficient for TNF-induced liver failure, hepatocyte apoptosis, and nitrite release. *J Immunol* **154**, 1307-16.
- Lemke, H., Hammerling, G. J., and Hammerling, U. (1979). Fine specificity analysis with monoclonal antibodies of antigens controlled by the major histocompatibility complex and by the Qa/TL region in mice. *Immunol Rev* **47**, 175-206.
- Lenschow, D. J., Walunas, T. L., and Bluestone, J. A. (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* **14**, 233-58.
- Leonard, J. P., Waldburger, K. E., and Goldman, S. J. (1995). Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against interleukin 12. *J Exp Med* **181**, 381-6.
- Leonard, J. P., Waldburger, K. E., Schaub, R. G., Smith, T., Hewson, A. K., Cuzner, M. L., and Goldman, S. J. (1997). Regulation of the inflammatory response in animal models of multiple

- sclerosis by interleukin-12. *Crit Rev Immunol* **17**, 545-53.
- Levitz, S. M., Mathews, H. L., and Murphy, J. W. (1995). Direct antimicrobial activity of T cells. *Immunol Today* **16**, 387-91.
- Li, S., and Huang, L. (1997). *In vivo* gene transfer via intravenous administration of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes. *Gene Ther* **4**, 891-900.
- Limmer, A., Sacher, T., Alferink, J., Kretschmar, M., Schonrich, G., Nichterlein, T., Arnold, B., and Hammerling, G. J. (1998). Failure to induce organ-specific autoimmunity by breaking of tolerance: importance of the microenvironment. *Eur J Immunol* **28**, 2395-406.
- Linsley, P. S., Brady, W., Grosmaire, L., Aruffo, A., Damle, N. K., and Ledbetter, J. A. (1991). Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J Exp Med* **173**, 721-30.
- Lipford, G. B., Sparwasser, T., Bauer, M., Zimmermann, S., Koch, E. S., Heeg, K., and Wagner, H. (1997). Immunostimulatory DNA: sequence-dependent production of potentially harmful or useful cytokines. *Eur J Immunol* **27**, 3420-6.
- Lipford, G. B., Bendigs, S., Heeg, K., and Wagner, H. (2000). Poly-guanosine motifs costimulate antigen-reactive CD8 T cells while bacterial CpG-DNA affect T-cell activation via antigen-presenting cell- derived cytokines [In Process Citation]. *Immunology* **101**, 46-52.
- Lipsky, M. M., Hinton, D. E., Klaunig, J. E., and Trump, B. F. (1981). Biology of hepatocellular neoplasia in the mouse. I. Histogenesis of safrole-induced hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **67**, 365-76.
- Little, M., Kipriyanov, S. M., Le Gall, F., and Moldenhauer, G. (2000). Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. *Immunol Today* **21**, 364-70.
- Liu, Y., and Janeway, C. A., Jr. (1990). Interferon gamma plays a critical role in induced cell death of effector T cell: a possible third mechanism of self-tolerance. *J Exp Med* **172**, 1735-9.
- Liu, Y., and Janeway, C. A., Jr. (1992). Cells that present both specific ligand and costimulatory activity are the most efficient inducers of clonal expansion of normal CD4 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 3845-9.
- Liu, J., Marino, M. W., Wong, G., Grail, D., Dunn, A., Bettadapura, J., Slavin, A. J., Old, L., and Bernard, C. C. (1998). TNF is a potent anti-inflammatory cytokine in autoimmune-mediated demyelination. *Nat Med* **4**, 78-83.
- Lobe, C. G., Koop, K. E., Kreppner, W., Lomeli, H., Gertsenstein, M., and Nagy, A. (1999). Z/AP, a double reporter for cre-mediated recombination. *Dev Biol* **208**, 281-92.
- Lohler, J., Gossmann, J., Kratzberg, T., and Lehmann-Grube, F. (1994). Murine hepatitis caused by lymphocytic choriomeningitis virus. I. The hepatic lesions. *Lab Invest* **70**, 263-78.
- Lotze, M. T., Grimm, E. A., Mazumder, A., Strausser, J. L., and Rosenberg, S. A. (1981). Lysis of fresh and cultured autologous tumor by human lymphocytes cultured in T-cell growth factor. *Cancer Res* **41**, 4420-5.
- Louis, H., Le Moine, O., Peny, M. O., Quertinmont, E., Fokan, D., Goldman, M., and Deviere, J. (1997). Production and role of interleukin-10 in concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* **25**, 1382-9.
- Lowin, B., Hahne, M., Mattmann, C., and Tschopp, J. (1994). Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature* **370**, 650-2.
- Luettig, B., Pape, L., Bode, U., Bell, E. B., Sparshott, S. M., Wagner, S., and Westermann, J. (1999). Naive and memory T lymphocytes migrate in comparable numbers through normal rat liver: activated T cells accumulate in the periportal field. *J Immunol* **163**, 4300-7.
- Lutwick, L. I. (1979). Relation between aflatoxin, hepatitis-B virus, and hepatocellular carcinoma. *Lancet* **1**, 755-7.
- MacAry, P. A., Holmes, B. J., and Kemeny, D. M. (1998). Ovalbumin-specific, MHC class I-restricted, alpha beta-positive, Tc1 and Tc0 CD8+ T cell clones mediate the *in vivo* inhibition of rat IgE. *J Immunol* **160**, 580-7.
- Macri, P., and Gordon, J. W. (1993). Transgenic animals as tools for investigating hepatocyte gene regulation and liver disease. *Prog Liver Dis* **11**, 1-25.
- Magone, M. T., Chan, C. C., Beck, L., Whitcup, S. M., and Raz, E. (2000). Systemic or mucosal administration of immunostimulatory DNA inhibits early and late phases of murine allergic conjunctivitis. *Eur J Immunol* **30**, 1841-50.
- Magone, M. T., Whitcup, S. M., Fukushima, A., Chan, C. C., Silver, P. B., and Rizzo, L. V. (2000).

- The role of IL-12 in the induction of late-phase cellular infiltration in a murine model of allergic conjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol* **105**, 299-308.
- Magram, J., Connaughton, S. E., Warrier, R. R., Carvajal, D. M., Wu, C. Y., Ferrante, J., Stewart, C., Sarmiento, U., Faherty, D. A., and Gately, M. K. (1996). IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. *Immunity* **4**, 471-81.
- Mahon, K. A., Chepelinsky, A. B., Khillan, J. S., Overbeek, P. A., Piatigorsky, J., and Westphal, H. (1987). Oncogenesis of the lens in transgenic mice. *Science* **235**, 1622-8.
- Manetti, R., Parronchi, P., Giudizi, M. G., Piccinni, M. P., Maggi, E., Trinchieri, G., and Romagnani, S. (1993). Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med* **177**, 1199-204.
- Mao, X., Fujiwara, Y., and Orkin, S. H. (1999). Improved reporter strain for monitoring Cre recombinase-mediated DNA excisions in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5037-42.
- Matsuda, M., Salazar, F., Petersson, M., Masucci, G., Hansson, J., Pisa, P., Zhang, Q. J., Masucci, M. G., and Kiessling, R. (1994). Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumor- and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression. *J Exp Med* **180**, 2371-6.
- Matsui, K., Yoshimoto, T., Tsutsui, H., Hyodo, Y., Hayashi, N., Hiroishi, K., Kawada, N., Okamura, H., Nakanishi, K., and Higashino, K. (1997). Propionibacterium acnes treatment diminishes CD4+ NK1.1+ T cells but induces type I T cells in the liver by induction of IL-12 and IL-18 production from Kupffer cells. *J Immunol* **159**, 97-106.
- McIntyre, K. W., Lombard-Gillooly, K., Perez, J. R., Kunsch, C., Sarmiento, U. M., Larigan, J. D., Landreth, K. T., and Narayanan, R. (1993). A sense phosphorothioate oligonucleotide directed to the initiation codon of transcription factor NF-kappa B p65 causes sequence-specific immune stimulation. *Antisense Res Dev* **3**, 309-22.
- McIntyre, K. W., Shuster, D. J., Gillooly, K. M., Warrier, R. R., Connaughton, S. E., Hall, L. B., Arp, L. H., Gately, M. K., and Magram, J. (1996). Reduced incidence and severity of collagen-induced arthritis in interleukin-12-deficient mice. *Eur J Immunol* **26**, 2933-8.
- McSorley, S. J., Soldera, S., Malherbe, L., Carnaud, C., Locksley, R. M., Flavell, R. A., and Gleichenhans, N. (1997). Immunological tolerance to a pancreatic antigen as a result of local expression of TNFalpha by islet beta cells. *Immunity* **7**, 401-9.
- Medzhitov, R., and Janeway, C. A., Jr. (1996). On the semantics of immune recognition. *Res Immunol* **147**, 208-14.
- Medzhitov, R., and Janeway, C. A., Jr. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* **9**, 4-9.
- Mehal, W. Z., and Crispe, I. N. (1998). TCR ligation on CD8+ T cells creates double-negative cells *in vivo*. *J Immunol* **161**, 1686-93.
- Mehal, W. Z., Juedes, A. E., and Crispe, I. N. (1999). Selective retention of activated CD8+ T cells by the normal liver. *J Immunol* **163**, 3202-10.
- Messina, J. P., Gilkeson, G. S., and Pisetsky, D. S. (1991). Stimulation of *in vitro* murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA. *J Immunol* **147**, 1759-64.
- Metzger, D., Clifford, J., Chiba, H., and Chambon, P. (1995). Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6991-5.
- Metzger, D., and Feil, R. (1999). Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Curr Opin Biotechnol* **10**, 470-6.
- Meyer zum Buschenfelde, K. H., Lohse, A. W., Manns, M., and Poralla, T. (1990). Autoimmunity and liver disease [see comments]. *Hepatology* **12**, 354-63.
- Meyers, C. M., and Zhang, Y. (1999). Immunomodulatory effects of interferon-gamma on autoreactive nephritogenic T-cell clones. *Kidney Int* **55**, 1395-406.
- Michael, S. K., Brennan, J., and Robertson, E. J. (1999). Efficient gene-specific expression of cre recombinase in the mouse embryo by targeted insertion of a novel IRES-Cre cassette into endogenous loci [published erratum appears in Mech Dev 1999 Aug;86(1-2):213]. *Mech Dev* **85**, 35-47.
- Miller, S. D., Vanderlugt, C. L., Begolka, W. S., Pao, W., Yauch, R. L., Neville, K. L., Katz-Levy, Y., Carrizosa, A., and Kim, B. S. (1997). Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading [see comments]. *Nat Med* **3**, 1133-6.

- Miniou, P., Tiziano, D., Frugier, T., Roblot, N., Le Meur, M., and Melki, J. (1999). Gene targeting restricted to mouse striated muscle lineage. *Nucleic Acids Res* **27**, e27.
- Möller P., Momburg F., Koretz K., Moldenhauer G., Herfarth C., Otto H.F., Hämmerling G.J. and Schlag P. (1991). Influence of major histocompatibility complex class I and II antigens on survival in colorectal carcinoma. *Cancer Research* **51**, 729-736.
- Momburg, F., Moller, P., Moldenhauer, G., and Hammerling, G. J. (1986). Loss of HLA-A,B,C in colorectal carcinoma is related to the degree of de-differentiation. *J Immunogenet* **13**, 195-9.
- Momburg, F., Degener, T., Bacchus, E., Moldenhauer, G., Hammerling, G. J., and Moller, P. (1986a). Loss of HLA-A,B,C and de novo expression of HLA-D in colorectal cancer. *Int J Cancer* **37**, 179-84.
- Momburg, F., Koch, N., Moller, P., Moldenhauer, G., Butcher, G. W., and Hammerling, G. J. (1986b). Differential expression of Ia and Ia-associated invariant chain in mouse tissues after *in vivo* treatment with IFN-gamma. *J Immunol* **136**, 940-8.
- Momburg, F., Ziegler, A., Harpprecht, J., Moller, P., Moldenhauer, G., and Hammerling, G. J. (1989). Selective loss of HLA-A or HLA-B antigen expression in colon carcinoma. *J Immunol* **142**, 352-8.
- Morgan, D. J., Kreuwel, H. T., Fleck, S., Levitsky, H. I., Pardoll, D. M., and Sherman, L. A. (1998). Activation of low avidity CTL specific for a self epitope results in tumor rejection but not autoimmunity. *J Immunol* **160**, 643-51.
- Morita, M., Watanabe, Y., and Akaike, T. (1994). Inflammatory cytokines up-regulate intercellular adhesion molecule-1 expression on primary cultured mouse hepatocytes and T-lymphocyte adhesion. *Hepatology* **19**, 426-31.
- Morton, D. L., Miller, G. F., and Wood, D. A. (1969). Demonstration of tumor-specific immunity against antigens unrelated to the mammary tumor virus in spontaneous mammary adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst* **42**, 289-301.
- Mosmann, T. R., and Coffman, R. L. (1989a). Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv Immunol* **46**, 111-47.
- Mosmann, T. R., and Coffman, R. L. (1989b). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* **7**, 145-73.
- Moudgil, K. D., and Sercarz, E. E. (1994). Can antitumor immune responses discriminate between self and nonself? *Immunol Today* **15**, 353-5.
- Mueller, R., Krahel, T., and Sarvetnick, N. (1996). Pancreatic expression of interleukin-4 abrogates insulinitis and autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med* **184**, 1093-9.
- Murali-Krishna K., Altman J.D., Suresh M., Sourdive D., Zajac A., Miller J., Slansky J. and Ahmed R. (1998). Counting Antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* **8**, 177-187.
- Murphy, K. M., Heimberger, A. B., and Loh, D. Y. (1990). Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCR α thymocytes *in vivo*. *Science* **250**, 1720-3.
- Myers, K. J., Eppihimer, M. J., Hall, L., and Wolitzky, B. (1998). Interleukin-12-induced adhesion molecule expression in murine liver. *Am J Pathol* **152**, 457-68.
- Nanda, N. K., and Sercarz, E. E. (1995). Induction of anti-self-immunity to cure cancer. *Cell* **82**, 13-7.
- Neefjes, J. J., and Momburg, F. (1993). Cell biology of antigen presentation. *Curr Opin Immunol* **5**, 27-34.
- Nordlund, J. J., Kirkwood, J. M., Forget, B. M., Milton, G., Albert, D. M., and Lerner, A. B. (1983). Vitiligo in patients with metastatic melanoma: a good prognostic sign. *J Am Acad Dermatol* **9**, 689-96.
- North, R. J. (1984). The therapeutic significance of concomitant antitumor immunity. I. LY-1- 2+ T cells from mice with a progressive tumor can cause regression of an established tumor in gamma-irradiated recipients. *Cancer Immunol Immunother* **18**, 69-74.
- O'Connell, K. A., and Gooding, L. R. (1984). Cloned cytotoxic T lymphocytes recognize cells expressing discrete fragments of the SV40 tumor antigen. *J Immunol* **132**, 953-8.
- O'Connell, J., O'Sullivan, G. C., Collins, J. K., and Shanahan, F. (1996). The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J Exp Med* **184**, 1075-82.
- O'Hara, R. M., Jr., Henderson, S. L., and Nagelin, A. (1996). Prevention of a Th1 disease by a Th1 cytokine: IL-12 and diabetes in NOD mice. *Ann N Y Acad Sci* **795**, 241-9.
- Ochsenbein, A. F., Klennerman, P., Karrer, U., Ludewig, B., Pericin, M., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. (1999). Immune surveillance against a solid tumor fails because of

- immunological ignorance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2233-8.
- Ogasawara, J., Watanabe-Fukunaga, R., Adachi, M., Matsuzawa, A., Kasugai, T., Kitamura, Y., Itoh, N., Suda, T., and Nagata, S. (1993). Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice [published erratum appears in *Nature* 1993 Oct 7;365(6446):568]. *Nature* **364**, 806-9.
- Ohashi, P. S., Oehen, S., Buerki, K., Pircher, H., Ohashi, C. T., Odermatt, B., Malissen, B., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H. (1991). Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell* **65**, 305-17.
- Ohashi, P. S., Oehen, S., Aichele, P., Pircher, H., Odermatt, B., Herrera, P., Higuchi, Y., Buerki, K., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. (1993). Induction of diabetes is influenced by the infectious virus and local expression of MHC class I and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* **150**, 5185-94.
- Ohira, H., Ueno, T., Shakado, S., Sakamoto, M., Torimura, T., Inuzuka, S., Sata, M., and Tanikawa, K. (1994). Cultured rat hepatic sinusoidal endothelial cells express intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) by tumor necrosis factor-alpha or interleukin-1 alpha stimulation. *J Hepatol* **20**, 729-34.
- Old L.J., Boyse, E.A., Clarke D.A., Carswell E. (1962). Antigenic properties of chemically induced tumors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **101**, 80.
- Oldstone, M. B., Nerenberg, M., Southern, P., Price, J., and Lewicki, H. (1991). Virus infection triggers insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model: role of anti-self (virus) immune response. *Cell* **65**, 319-31.
- Oldstone, M. B. (1998). Molecular mimicry and immune-mediated diseases. *Faseb J* **12**, 1255-65.
- Osborne, B. A. (1996). Apoptosis and the maintenance of homeostasis in the immune system. *Curr Opin Immunol* **8**, 245-54.
- Overwijk, W. W., Lee, D. S., Surman, D. R., Irvine, K. R., Touloukian, C. E., Chan, C. C., Carroll, M. W., Moss, B., Rosenberg, S. A., and Restifo, N. P. (1999). Vaccination with a recombinant vaccinia virus encoding a "self" antigen induces autoimmune vitiligo and tumor cell destruction in mice: requirement for CD4(+) T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2982-7.
- Panitch, H. S. (1994). Influence of infection on exacerbations of multiple sclerosis. *Ann Neurol* **36**, S25-8.
- Pardoll, D. M. (1994). Tumour antigens. A new look for the 1990s [news; comment]. *Nature* **369**, 357.
- Parker, S. L., Tong, T., Bolden, S., and Wingo, P. A. (1996). Cancer statistics, 1996 [see comments]. *CA Cancer J Clin* **46**, 5-27.
- Perdrizet, G. A., Ross, S. R., Stauss, H. J., Singh, S., Koeppen, H., and Schreiber, H. (1990). Animals bearing malignant grafts reject normal grafts that express through gene transfer the same antigen. *J Exp Med* **171**, 1205-20.
- Pichel, J. G., Lakso, M., and Westphal, H. (1993). Timing of SV40 oncogene activation by site-specific recombination determines subsequent tumor progression during murine lens development. *Oncogene* **8**, 3333-42.
- Pircher, H., Rohrer, U. H., Moskophidis, D., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H. (1991). Lower receptor avidity required for thymic clonal deletion than for effector T-cell function. *Nature* **351**, 482-5.
- Postic, C., Shiota, M., Niswender, K. D., Jetton, T. L., Chen, Y., Moates, J. M., Shelton, K. D., Lindner, J., Cherrington, A. D., and Magnuson, M. A. (1999). Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. *J Biol Chem* **274**, 305-15.
- Prehn, R.T. and Main, J.M. (1957). Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J.N.C.I.* **18**, 769.
- Prehn, R. T., and Bartlett, G. L. (1987). Surveillance, latency and the two levels of MCA-induced tumor immunogenicity. *Int J Cancer* **39**, 106-10.
- Prevost-Blondel, A., Zimmermann, C., Stemmer, C., Kulmburg, P., Rosenthal, F. M., and Pircher, H. (1998). Tumor-infiltrating lymphocytes exhibiting high ex vivo cytolytic activity fail to prevent murine melanoma tumor growth *in vivo*. *J Immunol* **161**, 2187-94.
- Prieto, J., Takei, F., Gendelman, R., Christenson, B., Biberfeld, P., and Patarroyo, M. (1989). MALA-2, mouse homologue of human adhesion molecule ICAM-1 (CD54). *Eur J Immunol* **19**, 1551-7.
- Ranges, G. E., Figari, I. S., Espevik, T., and Palladino, M. A., Jr. (1987). Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor beta and reversal by recombinant tumor necrosis factor

- alpha. *J Exp Med* **166**, 991-8.
- Raz, E. (2000). Immunostimulatory DNA-sequences (ISS). *Springer Seminars in Immunopathology*. Ausgabe 22, Nummer 1-2.
- Ressing, M. E., Sette, A., Brandt, R. M., Ruppert, J., Wentworth, P. A., Hartman, M., Oseroff, C., Grey, H. M., Melief, C. J., and Kast, W. M. (1995). Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through *in vivo* and *in vitro* immunogenicity studies of HLA- A*0201-binding peptides. *J Immunol* **154**, 5934-43.
- Rickert, R. C., Roes, J., and Rajewsky, K. (1997). B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res* **25**, 1317-8.
- Ridge, J. P., Di Rosa, F., and Matzinger, P. (1998). A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T- helper and a T-killer cell [see comments]. *Nature* **393**, 474-8.
- Rieder, H., Ramadori, G., Allmann, K. H., and Meyer zum Buschenfelde, K. H. (1990). Prostanoid release of cultured liver sinusoidal endothelial cells in response to endotoxin and tumor necrosis factor. Comparison with umbilical vein endothelial cells. *J Hepatol* **11**, 359-66.
- Rigby, P.W.J., Lane, D.P. (1983). Structure and function of simian virus large T-antigen. In: Klein, G. (Ed). *Advances in viral oncology*. New York, Raven Press **3**, 31-57.
- Rivoltini, L., Barracchini, K. C., Viggiano, V., Kawakami, Y., Smith, A., Mixon, A., Restifo, N. P., Topalian, S. L., Simonis, T. B., Rosenberg, S. A., and et al. (1995). Quantitative correlation between HLA class I allele expression and recognition of melanoma cells by antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res* **55**, 3149-57.
- Robbins, S.L., Cotran, R.S. (1979). Inflammation and repair. In: *Pathologic basis of disease*. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 59-63.
- Rohlmann, A., Gotthardt, M., Hammer, R. E., and Herz, J. (1998). Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants. *J Clin Invest* **101**, 689-95.
- Roman, M., Martin-Orozco, E., Goodman, J. S., Nguyen, M. D., Sato, Y., Ronaghy, A., Kornbluth, R. S., Richman, D. D., Carson, D. A., and Raz, E. (1997). Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants [see comments]. *Nat Med* **3**, 849-54.
- Romieu, R., Lacabanne, V., Kayibanda, M., Antoine, B., Bennoun, M., Chouaib, S., Guillet, J. G., and Viguier, M. (1997). Critical stages of tumor growth regulation in transgenic mice harboring a hepatocellular carcinoma revealed by distinct patterns of tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta mRNA production. *Int Immunol* **9**, 1405-13.
- Romieu, R., Baratin, M., Kayibanda, M., Lacabanne, V., Zioli, M., Guillet, J. G., and Viguier, M. (1998). Passive but not active CD8+ T cell-based immunotherapy interferes with liver tumor progression in a transgenic mouse model. *J Immunol* **161**, 5133-7.
- Rose, N.R. and Mackay, I.R. (1985). The autoimmune diseases of the liver: chronic active hepatitis and primary biliary cirrhosis. In: *The autoimmune diseases*. Academic Press. 291-337.
- Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Muul, L. M., Leitman, S., Chang, A. E., Ettinghausen, S. E., Matory, Y. L., Skibber, J. M., Shiloni, E., Vetto, J. T., and et al. (1985). Observations on the systemic administration of autologous lymphokine- activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* **313**, 1485-92.
- Rosenberg, S. A., Spiess, P., and Lafreniere, R. (1986). A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor- infiltrating lymphocytes. *Science* **233**, 1318-21.
- Rosenberg, S. A., Packard, B. S., Aebersold, P. M., Solomon, D., Topalian, S. L., Toy, S. T., Simon, P., Lotze, M. T., Yang, J. C., Seipp, C. A., and et al. (1988). Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report [see comments]. *N Engl J Med* **319**, 1676-80.
- Rosenberg, S.A. (1991). Principles of cancer management: Biologic therapy. In: *Cancer: Principles and practice of oncology*. 5. edition. Ed. DeVita V.T., Hellman, S., Rosenberg, S.A. 214-236.
- Rosenberg, S. A., and White, D. E. (1996). Vitiligo in patients with melanoma: normal tissue antigens can be targets for cancer immunotherapy. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* **19**, 81-4.
- Rosenberg, S.A. (1997). Principles of cancer management: Biologic therapy. In: *Cancer: Principles and practice of oncology*. 5. edition. Ed. DeVita V.T., Hellman, S., Rosenberg, S.A. 349-373.
- Rosenberg, M. P. (1997). Gene knockout and transgenic technologies in risk assessment: the next generation. *Mol Carcinog* **20**, 262-74.
- Rothe, H., O'Hara, R. M., Jr., Martin, S., and Kolb, H. (1997). Suppression of cyclophosphamide

- induced diabetes development and pancreatic Th1 reactivity in NOD mice treated with the interleukin (IL)-12 antagonist IL-12(p40)2. *Diabetologia* **40**, 641-6.
- Russell, J. Q., Morrisette, G. J., Weidner, M., Vyas, C., Aleman-Hoey, D., and Budd, R. C. (1998). Liver damage preferentially results from CD8(+) T cells triggered by high affinity peptide antigens. *J Exp Med* **188**, 1147-57.
- Ruther, U., Woodroffe, C., Fattori, E., and Ciliberto, G. (1993). Inducible formation of liver tumors in transgenic mice. *Oncogene* **8**, 87-93.
- Sandgren, E. P., Quaife, C. J., Pinkert, C. A., Palmiter, R. D., and Brinster, R. L. (1989). Oncogene-induced liver neoplasia in transgenic mice. *Oncogene* **4**, 715-24.
- Santucci, L., Fiorucci, S., Chiorean, M., Brunori, P. M., Di Matteo, F. M., Sidoni, A., Migliorati, G., and Morelli, A. (1996). Interleukin 10 reduces lethality and hepatic injury induced by lipopolysaccharide in galactosamine-sensitized mice. *Gastroenterology* **111**, 736-44.
- Saoudi, A., Simmonds, S., Huitinga, I., and Mason, D. (1995). Prevention of experimental allergic encephalomyelitis in rats by targeting autoantigen to B cells: evidence that the protective mechanism depends on changes in the cytokine response and migratory properties of the autoantigen-specific T cells [see comments]. *J Exp Med* **182**, 335-44.
- Sarvetnick, N., Shizuru, J., Liggitt, D., Martin, L., McIntyre, B., Gregory, A., Parslow, T., and Stewart, T. (1990). Loss of pancreatic islet tolerance induced by beta-cell expression of interferon-gamma. *Nature* **346**, 844-7.
- Sastry, K., and Ezekowitz, R. A. (1993). Collectins: pattern recognition molecules involved in first line host defense [published erratum appears in Curr Opin Immunol 1993 Aug;5(4):566]. *Curr Opin Immunol* **5**, 59-66.
- Sato, Y., Roman, M., Tighe, H., Lee, D., Corr, M., Nguyen, M. D., Silverman, G. J., Lotz, M., Carson, D. A., and Raz, E. (1996). Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science* **273**, 352-4.
- Satoh, S., Nussler, A. K., Liu, Z. Z., and Thomson, A. W. (1994). Proinflammatory cytokines and endotoxin stimulate ICAM-1 gene expression and secretion by normal human hepatocytes. *Immunology* **82**, 571-6.
- Scherer, M. T., Ignatowicz, L., Winslow, G. M., Kappler, J. W., and Marrack, P. (1993). Superantigens: bacterial and viral proteins that manipulate the immune system. *Annu Rev Cell Biol* **9**, 101-28.
- Schirmbeck, R., Zerrahn, J., Kuhrober, A., Kury, E., Deppert, W., and Reimann, J. (1992). Immunization with soluble simian virus 40 large T antigen induces a specific response of CD3+ CD4- CD8+ cytotoxic T lymphocytes in mice. *Eur J Immunol* **22**, 759-66.
- Schlepper-Schafer, J., Hulsman, D., Djovkar, A., Meyer, H. E., Herbertz, L., Kolb, H., and Kolb-Bachofen, V. (1986). Endocytosis via galactose receptors *in vivo*. Ligand size directs uptake by hepatocytes and/or liver macrophages. *Exp Cell Res* **165**, 494-506.
- Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. I., Offringa, R., and Melief, C. J. (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions [see comments]. *Nature* **393**, 480-3.
- Schonrich, G., Kalinke, U., Momburg, F., Malissen, M., Schmitt-Verhulst, A. M., Malissen, B., Hammerling, G. J., and Arnold, B. (1991). Down-regulation of T cell receptors on self-reactive T cells as a novel mechanism for extrathymic tolerance induction. *Cell* **65**, 293-304.
- Schonrich, G., Momburg, F., Malissen, M., Schmitt-Verhulst, A. M., Malissen, B., Hammerling, G. J., and Arnold, B. (1992a). Distinct mechanisms of extrathymic T cell tolerance due to differential expression of self antigen. *Int Immunol* **4**, 581-90.
- Schonrich, G., Momburg, F., Hammerling, G. J., and Arnold, B. (1992b). Anergy induced by thymic medullary epithelium. *Eur. J. Immunol.* **22**, 1687-1691.
- Schumann, J., Angermuller, S., Bang, R., Lohoff, M., and Tiegs, G. (1998). Acute hepatotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in mice depends on T cells and TNF. *J Immunol* **161**, 5745-54.
- Schwenk, F., Baron, U., and Rajewsky, K. (1995). A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP- flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res* **23**, 5080-1.
- Schwenk, F., Sauer, B., Kukoc, N., Hoess, R., Muller, W., Kocks, C., Kuhn, R., and Rajewsky, K. (1997). Generation of Cre recombinase-specific monoclonal antibodies, able to characterize the

- pattern of Cre expression in cre-transgenic mouse strains. *J Immunol Methods* **207**, 203-12.
- Schwenk, F., Kuhn, R., Angrand, P. O., Rajewsky, K., and Stewart, A. F. (1998). Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res* **26**, 1427-32.
- Scott, A. M., and Welt, S. (1997). Antibody-based immunological therapies. *Curr Opin Immunol* **9**, 717-22.
- Seddon, B., and Mason, D. (1999). Regulatory T cells in the control of autoimmunity: the essential role of transforming growth factor beta and interleukin 4 in the prevention of autoimmune thyroiditis in rats by peripheral CD4(+)CD45RC- cells and CD4(+)CD8(-) thymocytes. *J Exp Med* **189**, 279-88.
- Seder, R. A., Gazzinelli, R., Sher, A., and Paul, W. E. (1993). Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10188-92.
- Seder, R. A., and Paul, W. E. (1994). Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* **12**, 635-73.
- Segal, B. M., and Shevach, E. M. (1996). IL-12 unmasks latent autoimmune disease in resistant mice. *J Exp Med* **184**, 771-5.
- Segal, B. M., Chang, J. T., and Shevach, E. M. (2000). CpG oligonucleotides are potent adjuvants for the activation of autoreactive encephalitogenic T cells *in vivo*. *J Immunol* **164**, 5683-8.
- Sepulveda, A. R., Finegold, M. J., Smith, B., Slagle, B. L., DeMayo, J. L., Shen, R. F., Woo, S. L., and Butel, J. S. (1989). Development of a transgenic mouse system for the analysis of stages in liver carcinogenesis using tissue-specific expression of SV40 large T- antigen controlled by regulatory elements of the human alpha-1- antitrypsin gene. *Cancer Res* **49**, 6108-17.
- Sha, W. C., Nelson, C. A., Newberry, R. D., Kranz, D. M., Russell, J. H., and Loh, D. Y. (1988). Selective expression of an antigen receptor on CD8-bearing T lymphocytes in transgenic mice. *Nature* **335**, 271-4.
- Shibata, H., Toyama, K., Shioya, H., Ito, M., Hirota, M., Hasegawa, S., Matsumoto, H., Takano, H., Akiyama, T., Toyoshima, K., Kanamaru, R., Kanegae, Y., Saito, I., Nakamura, Y., Shiba, K., and Noda, T. (1997). Rapid colorectal adenoma formation initiated by conditional targeting of the Apc gene. *Science* **278**, 120-3.
- Shimizu, Y., Newman, W., Tanaka, Y., and Shaw, S. (1992). Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunol Today* **13**, 106-12.
- Simonetti, R. G., Camma, C., Fiorello, F., Politi, F., D'Amico, G., and Pagliaro, L. (1991). Hepatocellular carcinoma. A worldwide problem and the major risk factors. *Dig Dis Sci* **36**, 962-72.
- Singer, S. M., Tisch, R., Yang, X. D., and McDevitt, H. O. (1993). An Abd transgene prevents diabetes in nonobese diabetic mice by inducing regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 9566-70.
- Singh, S., Ross, S. R., Acena, M., Rowley, D. A., and Schreiber, H. (1992). Stroma is critical for preventing or permitting immunological destruction of antigenic cancer cells. *J Exp Med* **175**, 139-46.
- Smith, K. M., Olson, D. C., Hirose, R., and Hanahan, D. (1997). Pancreatic gene expression in rare cells of thymic medulla: evidence for functional contribution to T cell tolerance. *Int Immunol* **9**, 1355-65.
- Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain [letter]. *Nat Genet* **21**, 70-1.
- Sparwasser, T., Miethke, T., Lipford, G., Erdmann, A., Hacker, H., Heeg, K., and Wagner, H. (1997). Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor-alpha-mediated shock. *Eur J Immunol* **27**, 1671-9.
- Speiser, D. E., Chvatchko, Y., Zinkernagel, R. M., and MacDonald, H. R. (1990). Distinct fates of self-specific T cells developing in irradiation bone marrow chimeras: clonal deletion, clonal anergy, or *in vitro* responsiveness to self-Mls-1a controlled by hemopoietic cells in the thymus. *J Exp Med* **172**, 1305-14.
- Speiser, D. E., Miranda, R., Zakarian, A., Bachmann, M. F., McKall-FAutoimmunerkrankungennza, K., Odermatt, B., Hanahan, D., Zinkernagel, R. M., and Ohashi, P. S. (1997). Self antigens expressed by solid tumors Do not efficiently stimulate naive or activated T cells: implications for immunotherapy. *J Exp Med* **186**, 645-53.

- Sprent, J., Lo, D., Gao, E. K., and Ron, Y. (1988). T cell selection in the thymus. *Immunol Rev* **101**, 173-90.
- Sprent, J. (1997). Immunological memory. *Curr Opin Immunol* **9**, 371-9.
- Springer, T. A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**, 301-14.
- Stahl, H., and Knippers, R. (1987). The simian virus 40 large tumor antigen. *Biochim Biophys Acta* **910**, 1-10.
- Stahl, P. D. (1992). The mannose receptor and other macrophage lectins. *Curr Opin Immunol* **4**, 49-52.
- Staunton, D. E., Dustin, M. L., Erickson, H. P., and Springer, T. A. (1990). The arrangement of the immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus [published errata appear in *Cell* 1990 Jun 15;61(2):1157 and 1991 Sep 20;66(6):following 1311]. *Cell* **61**, 243-54.
- Stewart, T. A., Pattengale, P. K., and Leder, P. (1984). Spontaneous mammary adenocarcinomas in transgenic mice that carry and express MTV/myc fusion genes. *Cell* **38**, 627-37.
- Strand, S., Hofmann, W. J., Hug, H., Muller, M., Otto, G., Strand, D., Mariani, S. M., Stremmel, W., Krammer, P. H., and Galle, P. R. (1996). Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion? [see comments]. *Nat Med* **2**, 1361-6.
- Sun, S., Beard, C., Jaenisch, R., Jones, P., and Sprent, J. (1997). Mitogenicity of DNA from different organisms for murine B cells. *J Immunol* **159**, 3119-25.
- Sun, S., Kishimoto, H., and Sprent, J. (1998a). DNA as an adjuvant: capacity of insect DNA and synthetic oligodeoxynucleotides to augment T cell responses to specific antigen. *J Exp Med* **187**, 1145-50.
- Sun, S., Zhang, X., Tough, D. F., and Sprent, J. (1998b). Type I interferon-mediated stimulation of T cells by CpG DNA. *J Exp Med* **188**, 2335-42.
- Sun, S., Zhang, X., Tough, D., and Sprent, J. (2000). Multiple effects of immunostimulatory DNA on T cells and the role of type I interferons [In Process Citation]. *Springer Semin Immunopathol* **22**, 77-84.
- Sytwu, H. K., Liblau, R. S., and McDevitt, H. O. (1996). The roles of Fas/APO-1 (CD95) and TNF in antigen-induced programmed cell death in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* **5**, 17-30.
- Tagawa, Y., Sekikawa, K., and Iwakura, Y. (1997). Suppression of concanavalin A-induced hepatitis in IFN-gamma(-/-) mice, but not in TNF-alpha(-/-) mice: role for IFN-gamma in activating apoptosis of hepatocytes. *J Immunol* **159**, 1418-28.
- Takahashi, T., Tanaka, M., Brannan, C. I., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Suda, T., and Nagata, S. (1994). Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* **76**, 969-76.
- Takeda, K., Clausen, B. E., Kaisho, T., Tsujimura, T., Terada, N., Forster, I., and Akira, S. (1999). Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* **10**, 39-49.
- Tarone, R. E., Chu, K. C., and Ward, J. M. (1981). Variability in the rates of some common naturally occurring tumors in Fischer 344 rats and (C57BL/6N x C3H/HeN)F1 (B6C3F1) mice. *J Natl Cancer Inst* **66**, 1175-81.
- Tarrant, T. K., Silver, P. B., Chan, C. C., Wiggert, B., and Caspi, R. R. (1998). Endogenous IL-12 is required for induction and expression of experimental autoimmune uveitis. *J Immunol* **161**, 122-7.
- Tarrant, T. K., Silver, P. B., Wahlsten, J. L., Rizzo, L. V., Chan, C. C., Wiggert, B., and Caspi, R. R. (1999). Interleukin 12 protects from a T helper type 1-mediated autoimmune disease, experimental autoimmune uveitis, through a mechanism involving interferon gamma, nitric oxide, and apoptosis. *J Exp Med* **189**, 219-30.
- Tarutani, M., Itami, S., Okabe, M., Ikawa, M., Tezuka, T., Yoshikawa, K., Kinoshita, T., and Takeda, J. (1997). Tissue-specific knockout of the mouse *Pig-a* gene reveals important roles for GPI-anchored proteins in skin development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7400-5.
- Teitelman, G., Alpert, S., and Hanahan, D. (1988). Proliferation, senescence, and neoplastic progression of beta cells in hyperplastic pancreatic islets. *Cell* **52**, 97-105.
- Thomson, A. W., Satoh, S., Nussler, A. K., Tamura, K., Woo, J., Gavalier, J., and van Thiel, D. H. (1994). Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in autoimmune liver disease and evidence for the production of ICAM-1 by cytokine-stimulated human hepatocytes. *Clin Exp*

- Immunol* **95**, 83-90.
- Thorley-Lawson, D. A., Edson, C. M., and Geilinger, K. (1982). Epstein-Barr virus antigens-a challenge to modern biochemistry. *Adv Cancer Res* **36**, 295-348.
- Tian, J., Lehmann, P. V., and Kaufman, D. L. (1994). T cell cross-reactivity between coxsackievirus and glutamate decarboxylase is associated with a murine diabetes susceptibility allele. *J Exp Med* **180**, 1979-84.
- Tokunaga, T., Yano, O., Kuramoto, E., Kimura, Y., Yamamoto, T., Kataoka, T., and Yamamoto, S. (1992). Synthetic oligonucleotides with particular base sequences from the cDNA encoding proteins of *Mycobacterium bovis* BCG induce interferons and activate natural killer cells. *Microbiol Immunol* **36**, 55-66.
- Torre-Amione, G., Beauchamp, R. D., Koeppen, H., Park, B. H., Schreiber, H., Moses, H. L., and Rowley, D. A. (1990). A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 1486-90.
- Tough, D. F., Borrow, P., and Sprent, J. (1996). Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon *in vivo* [see comments]. *Science* **272**, 1947-50.
- Toyonaga, T., Hino, O., Sugai, S., Wakasugi, S., Abe, K., Shichiri, M., and Yamamura, K. (1994). Chronic active hepatitis in transgenic mice expressing interferon-gamma in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 614-8.
- Trembleau, S., Germann, T., Gately, M. K., and Adorini, L. (1995a). The role of IL-12 in the induction of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today* **16**, 383-6.
- Trembleau, S., Penna, G., Bosi, E., Mortara, A., Gately, M. K., and Adorini, L. (1995b). Interleukin 12 administration induces T helper type 1 cells and accelerates autoimmune diabetes in NOD mice. *J Exp Med* **181**, 817-21.
- Trinchieri, G. (1994). Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood* **84**, 4008-27.
- Trinchieri, G. (1995). Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* **13**, 251-76.
- Tsien, J. Z., Chen, D. F., Gerber, D., Tom, C., Mercer, E. H., Anderson, D. J., Mayford, M., Kandel, E. R., and Tonegawa, S. (1996). Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain [see comments]. *Cell* **87**, 1317-26.
- Tsomides, T. J., and Eisen, H. N. (1994). T-cell antigens in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 3487-9.
- Ullrich, S. E., and Kripke, M. L. (1984). Mechanisms in the suppression of tumor rejection produced in mice by repeated UV irradiation. *J Immunol* **133**, 2786-90.
- Vaage, J. (1968). Nonvirus-associated antigens in virus-induced mouse mammary tumors. *Cancer Res* **28**, 2477-83.
- van de Winkel, J. G., Bast, B., and de Gast, G. C. (1997). Immunotherapeutic potential of bispecific antibodies. *Immunol Today* **18**, 562-4.
- Van den Eynde, B. J., and van der Bruggen, P. (1997). T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol* **9**, 684-93.
- van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., and Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* **254**, 1643-7.
- van Ewijk, W., Ron, Y., Monaco, J., Kappler, J., Marrack, P., Le Meur, M., Gerlinger, P., Durand, B., Benoist, C., and Mathis, D. (1988). Compartmentalization of MHC class II gene expression in transgenic mice. *Cell* **53**, 357-70.
- van Oosten, M., van de Bilt, E., de Vries, H. E., van Berkel, T. J., and Kuiper, J. (1995). Vascular adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression on rat liver cells after lipopolysaccharide administration *in vivo* [see comments]. *Hepatology* **22**, 1538-46.
- Van Parijs, L., and Abbas, A. K. (1998). Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* **280**, 243-8.
- van Reijssen, F. C., Bruijnzeel-Koomen, C. A., Kalthoff, F. S., Maggi, E., Romagnani, S., Westland, J. K., and Mudde, G. C. (1992). Skin-derived aeroallergen-specific T-cell clones of Th2 phenotype in

- patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* **90**, 184-93.
- Vanderlugt, C. J., and Miller, S. D. (1996). Epitope spreading. *Curr Opin Immunol* **8**, 831-6.
- Vasioukhin, V., Degenstein, L., Wise, B., and Fuchs, E. (1999). The magical touch: genome targeting in epidermal stem cells induced by tamoxifen application to mouse skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8551-6.
- Vesselinovitch, S. D., and Mihailovich, N. (1983). Kinetics of diethylnitrosamine hepatocarcinogenesis in the infant mouse. *Cancer Res* **43**, 4253-9.
- Vierboom, M. P., Nijman, H. W., Offringa, R., van der Voort, E. I., van Hall, T., van den Broek, L., Fleuren, G. J., Kenemans, P., Kast, W. M., and Melief, C. J. (1997). Tumor eradication by wild-type p53-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* **186**, 695-704.
- Voehringer, D., Blaser, C., Grawitz, A. B., Chisari, F. V., Buerki, K., and Pircher, H. (2000). Break of T cell ignorance to a viral antigen in the liver induces hepatitis. *J Immunol* **165**, 2415-22.
- Volpes, R., van den Oord, J. J., and Desmet, V. J. (1992a). Can hepatocytes serve as 'activated' immunomodulating cells in the immune response? *J Hepatol* **16**, 228-40.
- Volpes, R., Van Den Oord, J. J., and Desmet, V. J. (1992b). Vascular adhesion molecules in acute and chronic liver inflammation. *Hepatology* **15**, 269-75.
- von Herrath, M. G., Guerder, S., Lewicki, H., Flavell, R. A., and Oldstone, M. B. (1995). Coexpression of B7-1 and viral ("self") transgenes in pancreatic beta cells can break peripheral ignorance and lead to spontaneous autoimmune diabetes. *Immunity* **3**, 727-38.
- von Herrath, M. G., and Oldstone, M. B. (1996). Virus-induced autoimmune disease. *Curr Opin Immunol* **8**, 878-85.
- von Herrath, M., and Holz, A. (1997). Pathological changes in the islet milieu precede infiltration of islets and destruction of beta-cells by autoreactive lymphocytes in a transgenic model of virus-induced IDDM. *J Autoimmun* **10**, 231-8.
- Vyse, T.J. and Todd, J.A. (1996). Genetic analysis of autoimmune disease. *Cell* **85**, 311-318.
- Wack, A., Corbella, P., Harker, N., Crispe, I. N., and Kioussis, D. (1997). Multiple sites of post-activation CD8+ T cell disposal. *Eur J Immunol* **27**, 577-83.
- Wagner, E. F., Stewart, T. A., and Mintz, B. (1981). The human beta-globin gene and a functional viral thymidine kinase gene in developing mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 5016-20.
- Wagner, H. (1999). Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger. *Adv Immunol* **73**, 329-68.
- Wagner H. (2000). Immunobiology of bacterial CpG-DNA. Current Topics in Microbiology and Immunology. Nummer 247. Springer Verlag Heidelberg.
- Walker, P. S., Schariton-Kersten, T., Krieg, A. M., Love-Homan, L., Rowton, E. D., Udey, M. C., and Vogel, J. C. (1999). Immunostimulatory oligodeoxynucleotides promote protective immunity and provide systemic therapy for leishmaniasis via IL-12- and IFN-gamma- dependent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6970-5.
- Wang, J., Wilhelmsson, H., Graff, C., Li, H., Oldfors, A., Rustin, P., Bruning, J. C., Kahn, C. R., Clayton, D. A., Barsh, G. S., Thoren, P., and Larsson, N. G. (1999). Dilated cardiomyopathy and atrioventricular conduction blocks induced by heart-specific inactivation of mitochondrial DNA gene expression. *Nat Genet* **21**, 133-7.
- Ward, J. M., Goodman, D. G., Squire, R. A., Chu, K. C., and Linhart, M. S. (1979). Neoplastic and nonneoplastic lesions in aging (C57BL/6N x C3H/HeN)F1 (B6C3F1) mice. *J Natl Cancer Inst* **63**, 849-54.
- Ward, B. A., Shu, S., Chou, T., Perry-Lalley, D., and Chang, A. E. (1988). Cellular basis of immunologic interactions in adoptive T cell therapy of established metastases from a syngeneic murine sarcoma. *J Immunol* **141**, 1047-53.
- Ward, P. L., Koeppen, H. K., Hurteau, T., Rowley, D. A., and Schreiber, H. (1990). Major histocompatibility complex class I and unique antigen expression by murine tumors that escaped from CD8+ T-cell-dependent surveillance. *Cancer Res* **50**, 3851-8.
- Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Nagata, S. (1992). Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* **356**, 314-7.
- Webb, S., Morris, C., and Sprent, J. (1990). Extrathymic tolerance of mature T cells: clonal elimination as a consequence of immunity. *Cell* **63**, 1249-56.
- Weinberg, R. A. (1989). Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep

- carcinogenesis. *Cancer Res* **49**, 3713-21.
- Weiner, G. J., Liu, H. M., Wooldridge, J. E., Dahle, C. E., and Krieg, A. M. (1997). Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10833-7.
- Whitton, J. L., and Fujinami, R. S. (1999). Viruses as triggers of autoimmunity: facts and fantasies. *Curr Opin Microbiol* **2**, 392-7.
- Wick, M., Dubey, P., Koeppen, H., Siegel, C. T., Fields, P. E., Chen, L., Bluestone, J. A., and Schreiber, H. (1997). Antigenic cancer cells grow progressively in immune hosts without evidence for T cell exhaustion or systemic anergy. *J Exp Med* **186**, 229-38.
- Willenborg, D. O., Fordham, S., Bernard, C. C., Cowden, W. B., and Ramshaw, I. A. (1996). IFN-gamma plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **157**, 3223-7.
- Williams, G. M. (1980). The pathogenesis of rat liver cancer caused by chemical carcinogens. *Biochim Biophys Acta* **605**, 167-89.
- Williams, G. M. (1997). Chemicals with carcinogenic activity in the rodent liver; mechanistic evaluation of human risk. *Cancer Lett* **117**, 175-88.
- Willmsky, G., and Blankenstein, T. (2000). Interleukin-7/B7.1-encoding adenoviruses induce rejection of transplanted but not nontransplanted tumors. *Cancer Res* **60**, 685-92.
- Wisse, E. (1970). An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *J Ultrastruct Res* **31**, 125-50.
- Wisse, E., De Zanger, R. B., Charels, K., Van Der Smissen, P., and McCuskey, R. S. (1985). The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse. *Hepatology* **5**, 683-92.
- Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J., and Mathison, J. C. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein [see comments]. *Science* **249**, 1431-3.
- Wright, S. D. (1995). CD14 and innate recognition of bacteria. *J Immunol* **155**, 6-8.
- Wu, C. H., Wilson, J. M., and Wu, G. Y. (1989). Targeting genes: delivery and persistent expression of a foreign gene driven by mammalian regulatory elements *in vivo*. *J Biol Chem* **264**, 16985-7.
- Wu, N. Z., Klitzman, B., Dodge, R., and Dewhirst, M. W. (1992). Diminished leukocyte-endothelium interaction in tumor microvessels. *Cancer Res* **52**, 4265-8.
- Wucherpfennig, K. W., and Strominger, J. L. (1995). Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* **80**, 695-705.
- Wysocka M., Kubin M., Vieira L., Ozmen L., Garotta G., Scott P. and Trinchieri G. (1995). Interleukin-12 is required for interferon-gamma production and lethality in LPS-induced shock in mice. *Eur. J. Immunol.* **25**, 672-676.
- Yamamoto, S., Kuramoto, E., Shimada, S., and Tokunaga, T. (1988). *In vitro* augmentation of natural killer cell activity and production of interferon-alpha/beta and -gamma with deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG. *Jpn J Cancer Res* **79**, 866-73.
- Yamamoto, S., Yamamoto, T., Shimada, S., Kuramoto, E., Yano, O., Kataoka, T., and Tokunaga, T. (1992). DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. *Microbiol Immunol* **36**, 983-97.
- Yang, X. D., Tisch, R., Singer, S. M., Cao, Z. A., Liblau, R. S., Schreiber, R. D., and McDevitt, H. O. (1994). Effect of tumor necrosis factor alpha on insulin-dependent diabetes mellitus in NOD mice. I. The early development of autoimmunity and the diabetogenic process. *J Exp Med* **180**, 995-1004.
- Yang, G., Mizuno, M. T., Hellstrom, K. E., and Chen, L. (1997). B7-negative versus B7-positive P815 tumor: differential requirements for priming of an antitumor immune response in lymph nodes. *J Immunol* **158**, 851-8.
- Ye, X., McCarrick, J., Jewett, L., and Knowles, B. B. (1994). Timely immunization subverts the development of peripheral nonresponsiveness and suppresses tumor development in simian virus 40 tumor antigen-transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 3916-20.
- Yi, A. K., Hornbeck, P., Lafrenz, D. E., and Krieg, A. M. (1996). CpG DNA rescue of murine B lymphoma cells from anti-IgM-induced growth arrest and programmed cell death is associated with increased expression of c-myc and bcl-xL. *J Immunol* **157**, 4918-25.
- Yokoi, H., Kato, K., Kezuka, T., Sakai, J., Usui, M., Yagita, H., and Okumura, K. (1997). Prevention

- of experimental autoimmune uveoretinitis by monoclonal antibody to interleukin-12. *Eur J Immunol* **27**, 641-6.
- Yoong, K. F., McNab, G., Hubscher, S. G., and Adams, D. H. (1998). Vascular adhesion protein-1 and ICAM-1 support the adhesion of tumor-infiltrating lymphocytes to tumor endothelium in human hepatocellular carcinoma. *J Immunol* **160**, 3978-88.
- Yu, M., Johnson, J. M., and Tuohy, V. K. (1996). A predictable sequential determinant spreading cascade invariably accompanies progression of experimental autoimmune encephalomyelitis: a basis for peptide-specific therapy after onset of clinical disease. *J Exp Med* **183**, 1777-88.
- Zhang, L., Fung-Leung, W., and Miller, R. G. (1995). Down-regulation of CD8 on mature antigen-reactive T cells as a mechanism of peripheral tolerance. *J Immunol* **155**, 3464-71.
- Zhang, Y., Riesterer, C., Ayrall, A. M., Sablitzky, F., Littlewood, T. D., and Reth, M. (1996). Inducible site-directed recombination in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* **24**, 543-8.
- Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D. F., and Sprent, J. (1998). Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cells *in vivo* by IL-15. *Immunity* **8**, 591-9.
- Zhao, Q., Temsamani, J., Iadarola, P. L., Jiang, Z., and Agrawal, S. (1996). Effect of different chemically modified oligodeoxynucleotides on immune stimulation. *Biochem Pharmacol* **51**, 173-82.
- Zheng, L., Fisher, G., Miller, R. E., Peschon, J., Lynch, D. H., and Lenardo, M. J. (1995). Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* **377**, 348-51.
- Zhu, N., Liggitt, D., Liu, Y., and Debs, R. (1993). Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice. *Science* **261**, 209-11.
- Zinkernagel, R. M., and Doherty, P. C. (1979). MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. *Adv Immunol* **27**, 51-177.

VIII. Abkürzungen

Alb	Albumin
ALT	Alanin-Aminotransferase
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
AST	Albumin-floxstop- T-Antigen
ATI	Albumin-Tag-invers
BAST	β-Aktin-floxstop-Tag
bio	Biotin
CD	Cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis
cre	cre-Rekombinase
CRP	C-reaktives Protein
CTL	cytotoxischer T-Lymphozyt
DesTZR	Désiré-T-Zell-Rezeptor (erkennt MHC Klasse I Molekül K ^b)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ER ^{T2}	Östrogen-Rezeptor Ligandbindedomäne (T2 Trippelmutante)
FACScan	Fluoreszenz-aktivierter Zell-Scanner
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HLA	Humanes Leukozytenantigen
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül
IDDM	Insulin-abhängiger Diabetes
IFN	Interferon
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
KZ	Kupffer Zelle (sessiler Makrophage der Leber)
Ker	Keratin
l	Liter
LAL	Leber-assoziierte Lymphozyten

LCMV	Lymphozyto-Choriomeningitis Virus
loxP	locus of crossing over of P1 bacteriophage
LPS	Lipopolysaccharid
LSEC	Leber-sinusoidale Endothelzellen
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	millimolar
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
MLR	Gemischte Lymphozyten-Kultur
mRNA	Boten-RNA
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
OD	Optische Dichte
ODN	Oligodeoxynukleotide
PAS	periodic schiff acid
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBS	phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
p.i.	post infectionem
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SA	Streptavidin
Std.	Stunde
Tag	Tumor-Antigen von SV40
Th	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TZR	T-Zell-Rezeptor
U/l	Units pro Liter
VCAM	vaskuläres Adhäsionsmolekül